2160

THESE

présentée

à

L'UNIVERSITE DE PARIS XI

CENTRE D'ORSAY

Pour obtenir le titre de Docteur 3ème Cycle

Spécialité : BIOCHIMIE

par

Martine LAPORTE

Sujet de la thèse : Mise en évidence de l'attachement du polysaccharide - 1 au Lipide A dans l'endotoxine de Bordetella pertussis.

Soutenue le : 25.10.76 devant la Commission d'examen

MM. E. SHECHTER Président

B. ROSSIGNOL

L. SZABO Examinateurs

T H E S E

p r é s e n t é e

à

L ' U N I V E R S I T E D E P A R I S X I

C E N T R E D ' O R S A Y

Pour obtenir le titre de Docteur 3ème Cycle

Spécialité : B I O C H I M I E

par

Martine LAPORTE

Sujet de la thèse : Mise en évidence de l'attachement du polysaccharide - 1 au Lipide A dans l'endotoxine de Bordetella pertussis.

Soutenue le : devant la Commission d'examen

MM. E. SHECHTER Président

B. ROSSIGNOL Examinateurs

L. SZABO

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Cette thèse a été effectuée à l'Institut de Biochimie de l'Université Paris XI, centre d'Orsay, dans le laboratoire de Monsieur SZABO, Directeur de Recherche. Monsieur SZABO m'a dirigée tout au long de ce travail, me prodiguant conseils et encouragements. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont à Monsieur E. SHECHTER qui m'a fait l'honneur de bien vouloir présider le jury et à Monsieur B. ROSSIGNOL qui a accepté d'en être membre.

Je remercie également Mademoiselle M.H. SARDA qui a effectué avec beaucoup d'amabilité la dactylographie de cette thèse.

Enfin, je tiens à remercier mes camarades de laboratoire et plus particulièrement Madame A. LEDUR pour leur aide et leur attitude très amicale qui ont facilité l'accomplissement de ce travail.

TABLE DES MATIERES

I INTRODUCTION

II METHODES ANALYTIQUES

III CHOIX DES CONDITIONS D'HYDROLYSE DE L'ENDOTOXINE

- Contrôle de l'action de la potasse sur les constituants majeurs de l'endotoxine.

- Contrôle de l'efficacité de la fragmentation de l'endotoxine.

IV FRAGMENTATION ET ANALYSE

- Contrôle de la dialyse.

- Analyse du pic 2.

- Analyse du pic 12.

V RESUME ET CONCLUSIONS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548118_0002

INTRODUCTION

L'enveloppe cellulaire des bactéries à gram négatif est essentiellement constituée de trois couches. (fig. 1 page 3)

La plus interne qui est impliquée dans les mécanismes de transport de la cellule est la membrane cytoplasmique, elle est principalement constituée de protéines et de phospholipides.

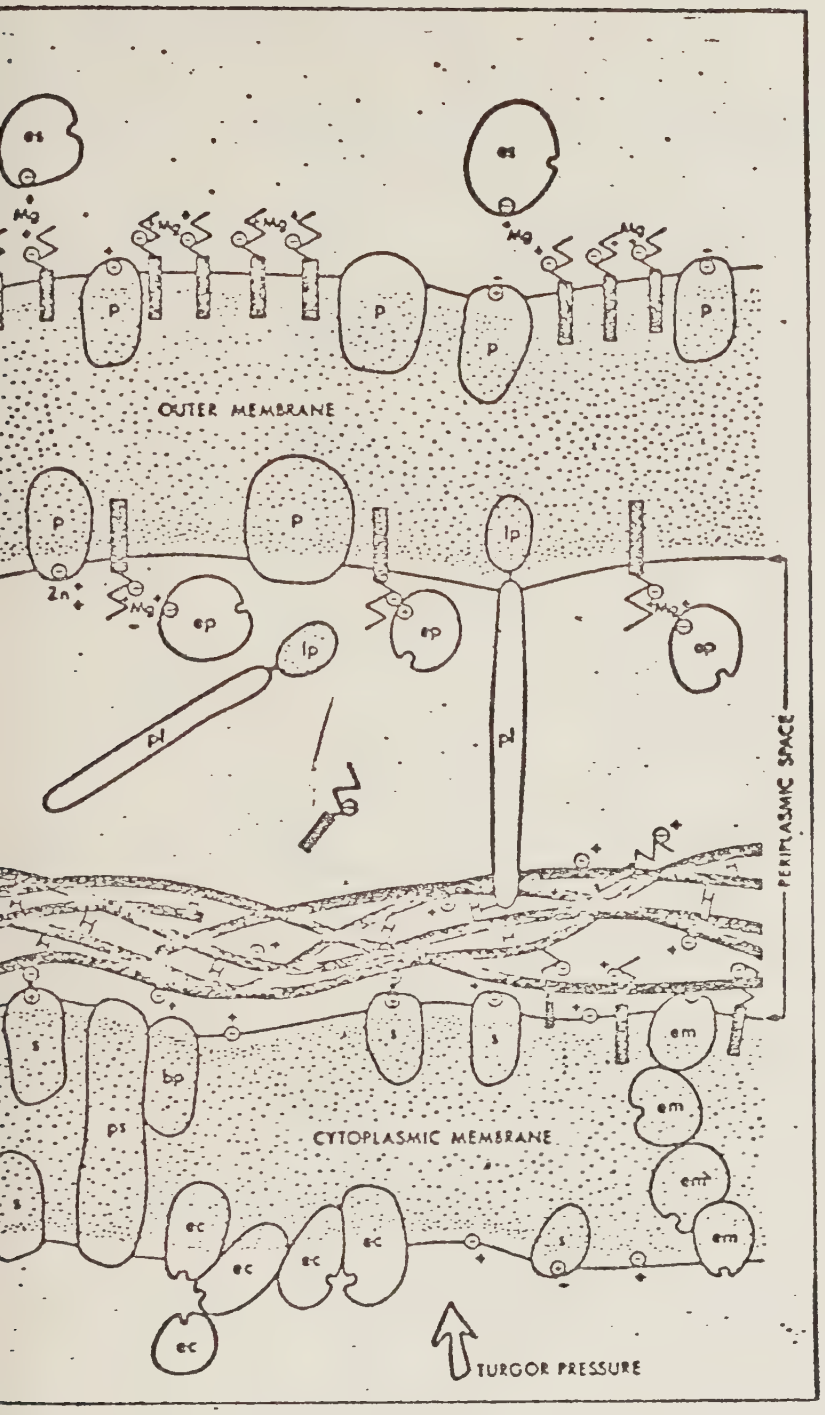
Cette membrane est couverte par le peptidoglycane, une couche rigide qui donne sa forme à la bactérie et lui sert de couche protectrice. Elle est constituée de la répétition d'une unité de base formée de N-acétyl-D-glucosamine liée en βI-6 à de l'acide N-acétyl-muramique, substitué par de courtes chaînes peptidiques. (1)

Dans la couche la plus externe, constituée de phospholipides et de protéines est située l'endotoxine qui est considérée comme un lipopolysaccharide (LPS) du point de vue chimique.

Du fait même de sa position de contact direct avec l'environnement, on comprend l'importance que revêt cette couche, aussi bien pour la cellule elle-même que pour un hôte éventuel qui devra exercer contre elle ses mécanismes de défense.

Parmi les propriétés biologiques des endotoxines, on trouve des activités variées telles que la pyrogénéicité, la toxicité, l'interféronémie et une gamme étendue d'activités immunologiques qui peuvent être bénéfiques comme la stimulation d'une résistance non spécifique ou néfastes comme les réactions de sensibilisation.

Parmi les bactéries à gram négatif, ce sont les Entérobactéries qui ont été les plus étudiées, en particulier les Salmonelles. (2,3,4,5).



: LPS

. . . . . membrane externe

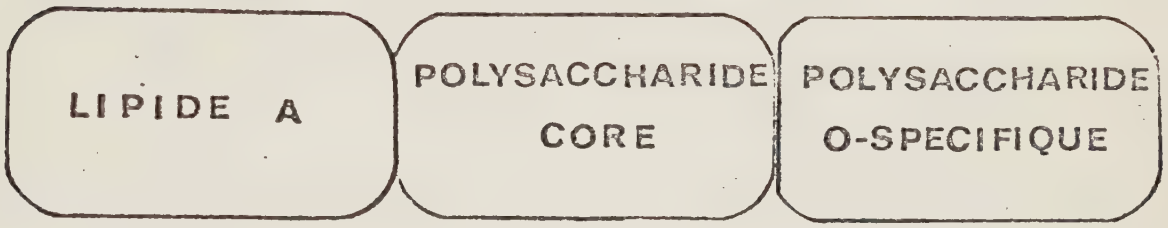
. . . . . peptidoglycane

. . . . . membrane cytoplasmique

Fig. 1

L'étude de leur lipopolysaccharide a conduit à la mise en évidence de trois grandes régions :

- une région lipidique généralement appelée Lipide A,
- une région polysaccharidique, commune à toutes les Salmonelles, appelée Core,
- et une dernière, également de nature osidique et constituée d'unités répétitives d'oligosaccharides, appelée chaîne O-spécifique, cette troisième région étant spécifique de chaque espèce.



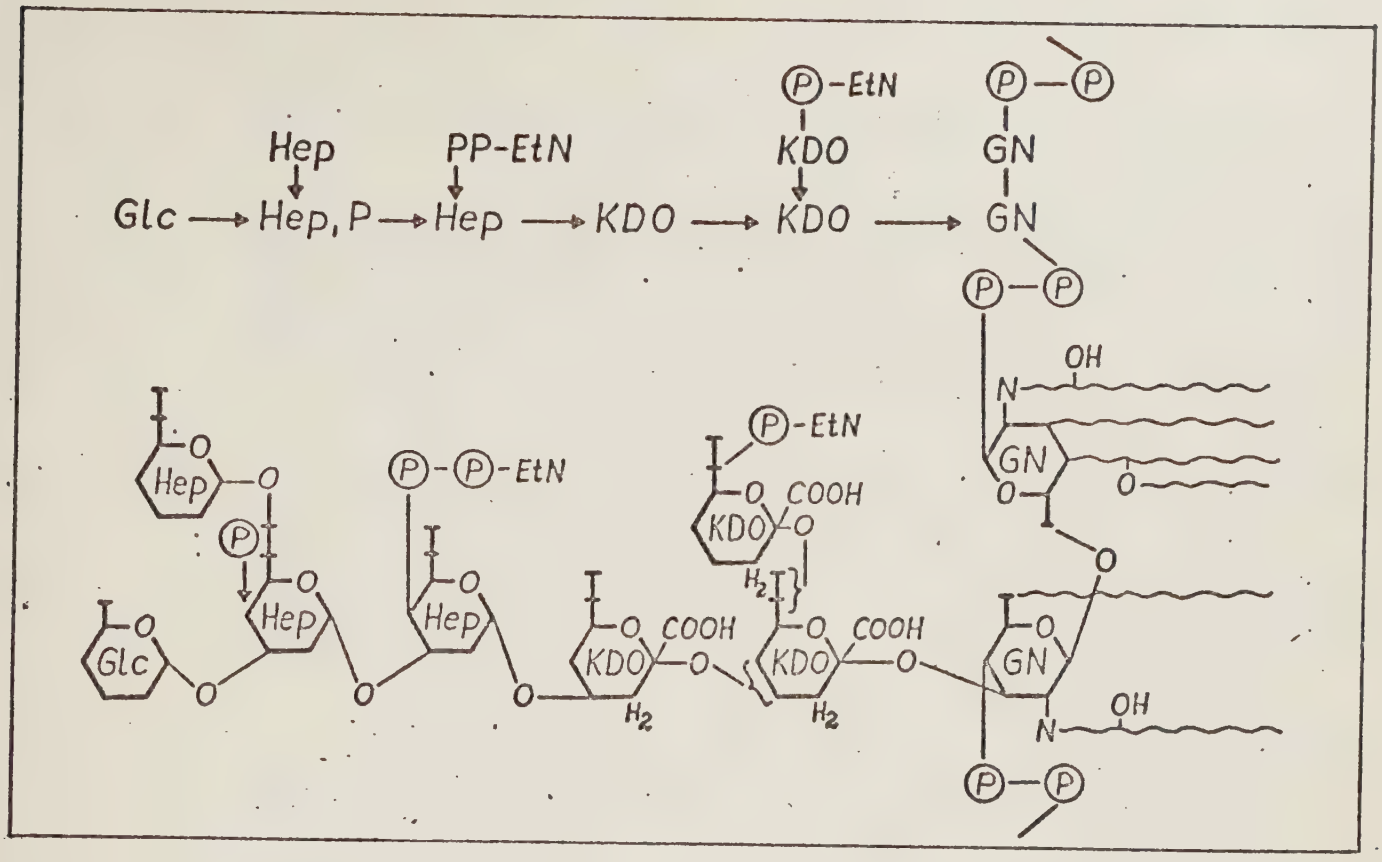
Certains auteurs (6) postulent que la structure du Lipide A est très proche, sinon identique chez toutes les Entérobactéries. (7,8,9). Ce dernier serait formé d'unités glucosaminyl-glucosamines reliées par des ponts pyrophosphates (fig. 2 page 5). Sur ces glucosamines tous les groupes hydroxyles et amines seraient substitués par des acides gras à longue chaîne (10, 11).

Dans le cas des Salmonelles un trisaccharide d'acide 2 ceto-3-desoxy-D-manno-octonique (KDO) relie la chaîne polysaccharidiq à la partie lipidique. (12). Par contre, chez Escherichia coli J5 qui est aussi une Entérobactérie, une seule molécule de KDO relie la partie osidique à la macromolécule lipidique. (13).

Peu d'études ont été entreprises sur les bactéries à gram négatif qui ne soient pas de Entérobactéries. C'est une des raisons pour laquelle notre équipe a choisi de travailler sur l'endotoxine de Bordetella pertussis, agent pathogène de la coqueluche qui est une bactérie de la famille des Brucellées.

De plus, ce microorganisme est produit sur une grande échelle par l'industrie pharmaceutique, ce qui présente un avantage

-A- GLYCOLIPIDE DE SALMONELLE (9)


Glc
Hep
Hep, P
PP-EtN
Hep
KDO
P-EtN
KDO
GN
P—P
GN
Hep
Glc
Hep
Hep
P-P-EtN
P-EtN
KDO
COOH
KDO
COOH
GN
GN
OH
OH
N
N
O
O
O

certain si l'on sait que 160 litres de culture ne permettent d'obtenir que, approximativement, 1,6g de lipopolysaccharide pur.

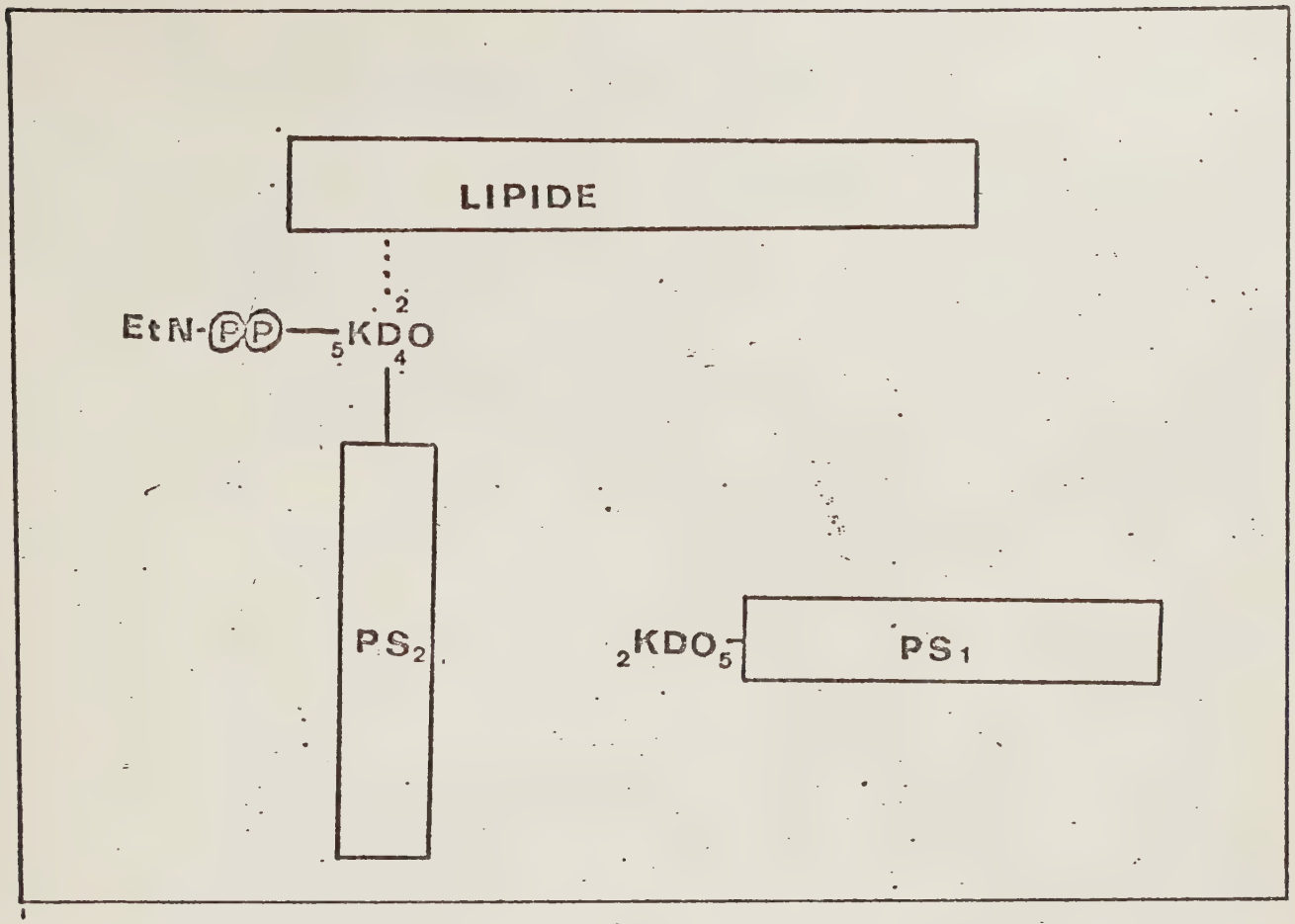
L'endotoxine de Bortella pertussis présente les activités biologiques généralement observées pour les bactéries à gram négatif. Elle confère une immunité non spécifique à l'hôte aussi bien vis à vis de bactéries à gram négatif que positif, et de certains virus ; elle présente un pouvoir adjuvant élevé (14).

Il a été montré également que cette endotoxine provoque une interféronémie chez la souris (15). On a remarqué de plus qu'elle n'a pas de toxicité aigue (16) et que, in vitro, elle exerce une action mitogène sur les lymphocytes B (17). L'injection de germes tués de ce microorganisme provoque une lymphocytose prononcée.

Les études éffectuées au sein de notre équipe ont prouvé que le schéma structural généralement admis pour les endotoxines des Enterobactéries n'était pas applicable à l'endotoxine de B. pertussis. Il a été proposé la structure suivante (fig.3 page 7) : le lypopolysaccharide est constitué d'une partie lipidique et de deux chaînes polyosidiques de poids moléculaires différents. Chacune de ces chaînes a pour sucre terminal une molécule de KDO, mais ces molécules sont différemment substituées : dans le PS_1, la chaîne osidique est attachée à la position 5 de la molécule de KDO alors que dans le PS_2, c'est en position 5 que le KDO est phosphorylé, la chaîne osidique se trouvant attachée à son groupe hydroxyle en 4.

Alors que R. CHABY (15) a démontré que le KDO-P était lié osidiquement à la macromolécule lipidique, le point de rattachement du PS_1 au reste de la macromolécule restait à déterminer, pour rendre compte de la structure globale de l'endotoxine. C'est la résolution de ce problème qui fait l'objet du présent travail.

Dans le cas des Salmonelles, un problème analogue s'était posé lors de la détermination de la liaison du Core au reste de la structure. Cependant, l'existence de souches mutantes dites souches mutantes R a facilité cette étude. Ces mutants R synthétisent un lipopolysaccharide défectueux dépourvu de polysaccharide O-spécifique, et leur core est plus ou moins complet ; l'obtention d'un mutant ne possèdant plus que le lipide et le trisaccharide de KDO a permis de montrer que ce trisaccharide était l'élément de liaison


LIPIDE
2
EtN-PP—5KDO
4
PS2
2KDO5—PS1

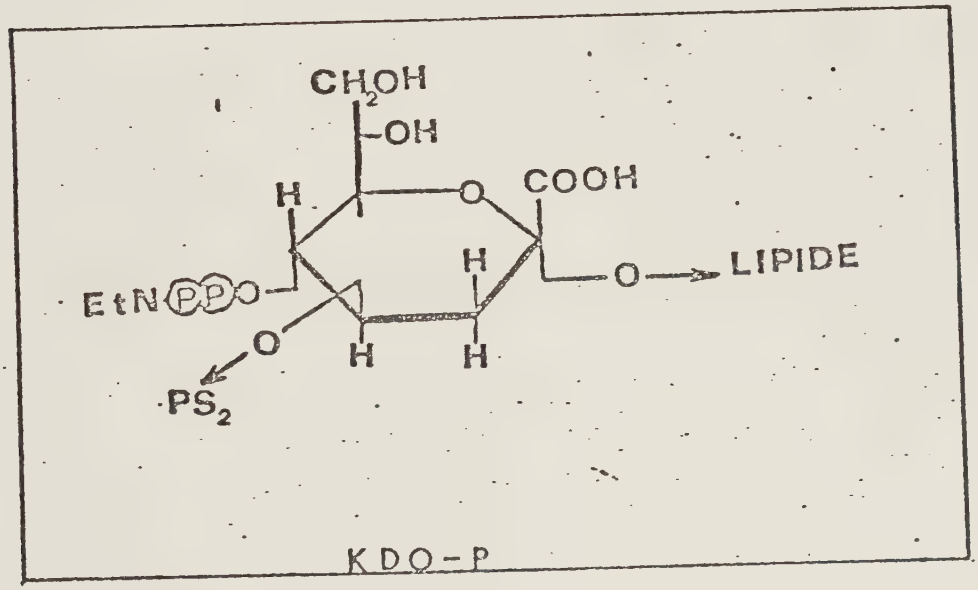
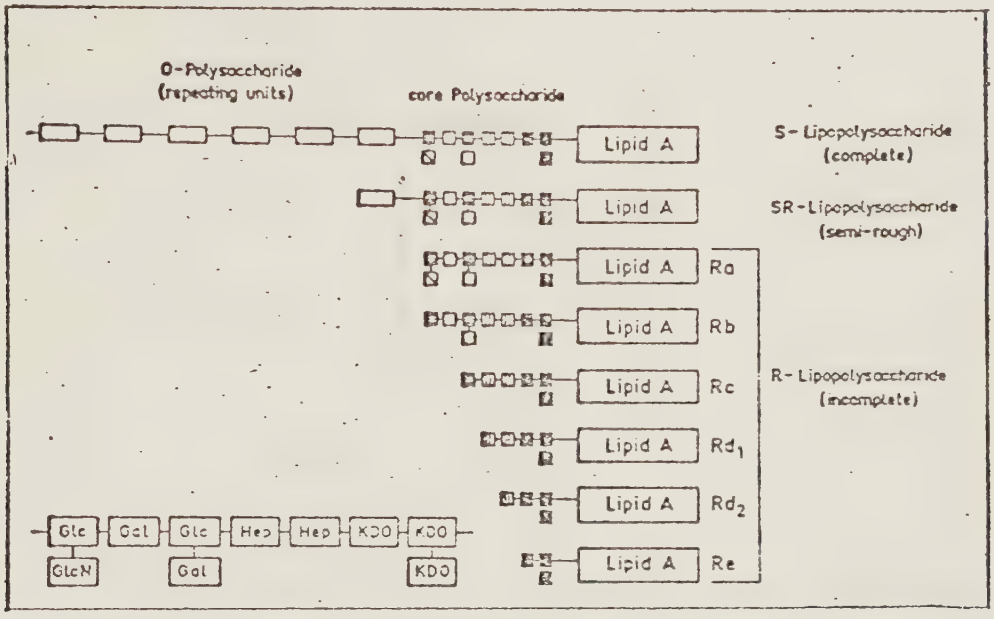

CH2OH
OH
H
O
COOH
H
O
LIPIDE
EtN-PP-O
O
H
H
PS2
KDO-P

Fig. 3

entre les polysaccharides et le lipide A.

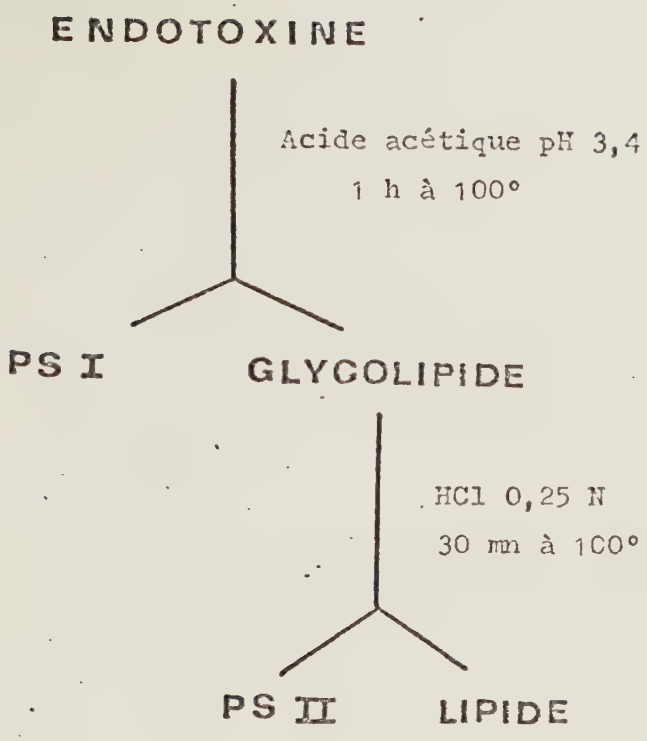
Représentation schématique de la structure des lypopolysaccharides des formes S et R. (20):



De tels mutants ne sont pas connus chez B. pertussis : il fallait donc trouver une autre méthodologie.

Une hydrolyse acide douce est généralement employée pour l'étude structurale des endotoxines. Cette hydrolyse clive la liaison cétosidique du KDO et sépare ainsi le lipide A de la partie osidique de la macromolécule.

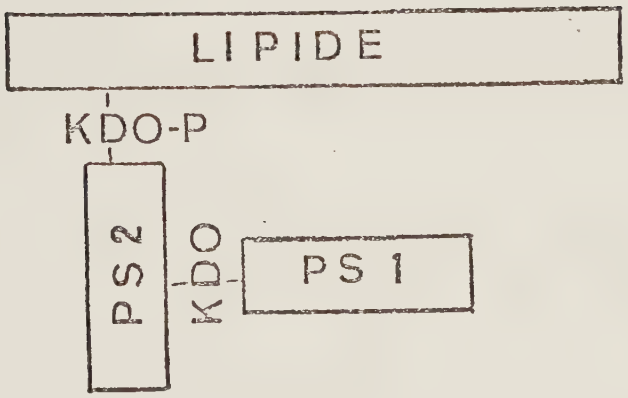
Dans le cas de B. pertussis, l'existence de deux chaînes polyosidiques ne permet pas leur séparation du lipide A à l'aide d'une seule hydrolyse acide douce. En effet, une hydrolyse par l'acide acétique pH 3,4; 1 h à 100° libère le PS_1 et un glycolipide. Après une hydrolyse plus forte (HCl 0,25 N, 30mn à 100°) ce glycolipide libère le PS_2 de la partie lipidique du lipopolysaccharide.



Nous savons (15) qu'il n'existe pas de liaison KDO ⟶ KDO dans l'endotoxine de B. pertussis. On ne peut donc envisager que deux possibilités de rattachement du PS_1 au reste de la structure : le PS_1 est rattaché soit à la partie lipidique soit à l'autre polysaccharide le PS_2. (fig.4 page10).

Les hydrolyses employées au cours de l'étude de l'endotoxine de B. pertussis clivent les liaisons des deux molécules de KDO : il est donc évident qu'une fragmentation de la macromolécule suivant un tel traitement ne pouvait pas permettre d'aborder le problème de la détermination de la liaison du PS_1 au glycolipide. Par contre, l'application d'une hydrolyse alcaline, agissant au niveau de liaisons de nature différente, pouvait fournir des renseignements à ce sujet.

Nous avons déjà vu dans le schéma structural de l'endotoxine des Salmonelles que la partie lipidique était constituée d'un enchaînement d'unités glucosaminyl-glucosamines reliées par des ponts pyrophosphates (9). Les analyses effectuées sur l'endotoxine de B. pertussis (15) ont permis de mettre en évidence de la glucosamine phosphate en quantité importante au niveau du lipide, et du lipide seul.



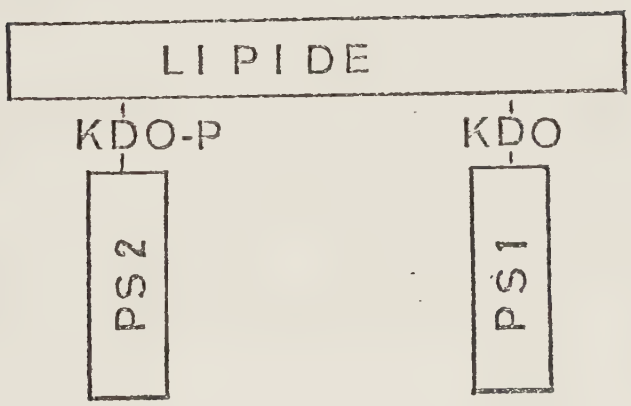


Fig. 4

De plus, bien que la structure du lipopolysaccharide des Entérobactéries ne soit pas applicable dans le cas de B. pertussis, nous pouvions penser que la structure du lipide A était commune aux bactéries à gram négatif. En effet, il a été montré par de nombreux auteurs (18,19) que le lipide A était la structure responsable de la plupart des activités biologiques des endotoxines et, comme nous l'avons déjà dit, nous retrouvons chez B. pertussis les mêmes activités biologiques que chez toutes les bactéries à gram négatif.

Nous avons donc pris comme hypothèse de base qu'une structure proche de celle du lipide des Salmonelles était présente dans la partie lipidique de l'endotoxine de B. pertussis.

Cette hypothèse une fois posée, il était légitime de penser qu'une hydrolyse alcaline qui devait cliver les ponts pyrophosphate permettrait de tronçonner la région lipidique et d'obtenir des fragments relativement petits pouvant être séparés par des méthodes appropriées. La présence de l'une ou de l'autre des chaînes polysaccharidiques serait alors décelable par les dosages de KDO et de KDO-P respectivement.

L'hydrolyse alcaline n'altère pas les liaisons osidiques, elle devait donc permettre de conserver intacte celle du KDO non phosphorylé et de son aglycone. Nous nous sommes donc proposés de rechercher tout d'abord s'il s'était formé un fragment contenant à la fois du KDO non phosphorylé, des sucres neutres et l'un ou plusieurs des constituants spécifiques du fragment lipidique comme des acides gras ou de la glucosamine phosphate (tableau 1) mais ne contenant pas de KDO-P. L'existence d'un tel fragment prouverait sans équivoque que le PS_1 tout comme le PS_2 est directement lié à la partie lipidique de l'endotoxine.

Répartition de certains constituants de l'endotoxine :

	P	sucres neutres	KDO	glucosamine	glucosamine-P	acides gras
endotoxine	2,6	11	0,32	19	+	27,5
glycolipide	2,3	8	0,24	14	+	37,8
PS I	0	20	1,1	19	-	0
PS II	1,8	18	0,26	17	-	0

Tableau 1

+ : présence

- : absence

Les valeurs reportées dans le tableau sont données en pourcentage du poids de chaque fraction étudiée.

METHODES ANALYTIQUES

I - DOSAGES

a) Dosage des sucres totaux :

Ce dosage est effectué selon la méthode colorimétrique de DUBOIS et coll. (21). Les sucres sont détruits par l'acide sulfurique pour former des dérivés de type furfural qui donnent avec le phénol des colorants ayant un maximum d'absorption à 490 nm si le sucre dosé est un hexose et à 480 nm s'il s'agit d'un pentose ou d'un acide uronique.

Le coefficient d'absorption molaire des différents oses n'étant pas le même, lorsque l'on est en présence de plusieurs glucides, la valeur obtenue n'est pas représentative de la teneur réelle en sucre. On l'exprime alors en "valeur" de glucose, heptose, etc...

b) Dosage des hexosamines :

Pour être dosées, elles doivent être libres. On les dose donc après une hydrolyse par HCl, 4N, 6 heures à 100° par la méthode de RONDLE et MORGAN (22) avec de la glucosamine comme référence et, après élimination de l'acide chlorhydrique, par évaporation sous vide en présence de potasse.

c) Dosage de l'acide 2-céto-3-désoxyoctonique (KDO) :

WARAVDERAR et SASLAW (23) ont montré que l'acide β-formylpyruvique formé au cours du traitement du KDO (non substitué) par le périodate peut être condensé avec l'acide 2-thiobarbiturique pour donner un colorant rouge ayant un maximum d'absorption à 550 nm.

Ces auteurs ont pensé que pour que le KDO puisse, après traitement par le périodate, donner de l'acide β-formyl-pyruvique, il fallait qu'il soit libre en positions 4 et 5. Cependant, CHARON (24) a montré que si le KDO était substitué en position 4, il se condensait, après traitement au périodate, avec l'acide 2-thiobarbiturique mais possédait alors un coefficient d'extinction molaire 30 fois plus faible ; tandis que s'il était substitué en position 5 il répondait 7 fois moins au dosage que le KDO non substitué.

Il a été observé au cours de différents dosages du KDO dans le LPS que les désoxysucres interféraient dans le dosage ; en effet, une fois clivés par le périodate, les désoxysucres donnent du malonaldéhyde qui se condense avec le thiobarbiturate pour donner un colorant qui absorbe 532 nm.

De ce fait, il a été mis au point dans l'équipe une formule permettant d'annuler cette interférence :

$$\% \text{ KDO} = \frac{0{,}66\ (2\text{x absorbance}_{550\ nm} - \text{absorbance}_{532\ nm}) \times 0{,}659}{\text{mg de lipopolysaccharide}}$$

d) Dosage de l'acide 2 ceto-3-desoxy octonique phosphorylé en 5 (KDO - P) et substitué en position 4; présent dans l'endotoxine de B. pertussis.:

La liaison osidique du KDO-P n'est pas clivée par l'hydrolyse qui clive celle du KDO non phosphorylé, si bien que ce KDO-P n'est pas dosable directement par la méthode précédente. Ceci permet toutefois de le doser sélectivement dans un mélange, après avoir libéré et réduit le KDO non phosphorylé.

Pour cliver la liaison osidique du KDO-P, une hydrolyse par HCl 0,25N aurait suffi ; mais cette hydrolyse aurait alors libéré un KDO substitué, non seulement en 5 par du phosphate, mais aussi en 4 par le reste de la chaîne osidique du PS_2. En raison de cela, on aurait obtenu une réponse trop faible dans les conditions habituelles de dosage. Nous étions donc obligés d'avoir recours à une hydrolyse beaucoup plus forte (HCl 2N) : celle-ci libère un KDO uniquement substitué en 5, et donc dosable de la même manière que le KDO non phosphorylé.

On opère de la manière suivante :

La substance à doser est hydrolysée par 1 ml d'acide acétique pH = 3,4 pendant 1 heure à 100°. On évapore à sec l'hydrolysat, puis on réduit par 1 ml d'une solution glacée de borohydrure de sodium (à 1 mg/ml) pendant 30' à 0°.
Le borohydrure de sodium en excès est détruit par 5 gouttes d'acide acétique.

On évapore à sec, puis on hydrolyse par 0,5 ml de HCl (2N) pedant 1h30 à 100°. On évapore à sec et l'on reprend deux fois le résidu par 1 ml de toluène pour éliminer l'acide. On effectue alors sur cette substance un dosage normal au thiobarbiturate, selon le protocole décrit précédemment.

En dépit du fait que le lipopolysaccharide entier , traité dans des conditions identiques soit utilisé comme substance de référence, ce dosage est moins précis que celui du KDO non phosphorylé, car il recquiert un plus grand nombre d'étapes dont une hydrolyse forte, ce qui augmente l'incertitude du résultat.

e) Dosage du phosphore :

Nous avons dosé le phosphore par la méthode de CHEN, TORIBARA, WARNER (25) qui permet de doser de petites quantités (1,5 µg)

f) Dosage des acides gras :

Après une hydrolyse par HCl (2N) à 100° pendant 2h, les acides gras libérés sont extraits au chloroforme puis estérifiés par du diazométhane. Les esters méthyliques ainsi formés sont alors dosés par la méthode de SNYDER et STEPHENS (26) avec pour référence, une gamme de stéarate de méthyle.

II - TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES ET CHROMATOGRAPHIQUES

a) Papier :

Pour la chromatographie, on utilise du papier WHATMAN 1.
Pour les électrophorèses, on utilise du papier WHATMAN 3 mm.

b) Tampons :

Pour les électrophorèses, nous avons utilisé :

Tampon pH 1,9 : (0,6 M)
- acide formique 250 ml
- acide acétique 870 ml
- H_2O qsp 10 l.

Tampon pH 5 : (0,2 M)
- acide acétique 114 ml
- pyridine 160 ml
- H_2O qsp 10 l.

Tampon pH 6,5 : (0,06 M)
- pyridine 100 ml
- acide acétique 4 ml
- H_2O qsp 10 l.

Tampon pH 7,2 : (0,2 M)
- N-méthyl morpholine 200 ml
- acide acétique 76 ml
- H_2O qsp 10 l.

c) Solvants de chromatographie :

Pour les solvants de chromatographie ascendante sur papier, nous avons utilisé :
- méthyl éthyl cétone, acide formique, méthanol, eau (4 ; 2 ; 2 ; 1,5) pendant 5 h.
- acide isobutyrique, ammoniaque N(5 ;3) pendant 21h.

d) Procédés de révélation :

- KDO : réactif au périodate/thiobarbiturate.
- Fonctions NH_2 libre : réactif à la ninhydrine-collidine
- Composés réducteurs : réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN et col (27).

e) Résines et gels :

Comme résine échangeuse de cations, nous avons utilisé la résine IRC 50 H^+ et la résine DOWEX 50 H^+.
Pour la chromatographie sur gel, nous avons utilisé des Biogels P 60, P 30, P 10 et P_2 (Bio Rad) dans des colonnes Pharmacia ; nous les avons éluées à l'eau distillée, à température ambiante.

III - APPAREILS

Les spectres dans le visible et l'ultra violet ont été pris avec un spectrophotomètre Varian Techtron modèle 635.

Nous avons utilisé des appareils d'électrophorèse sur plaque horizontale (SAVANT INSTRUMENT) d'une longueur de 75 cm.

La radioactivité sur des bandes de papier a été mesurée à l'aide du Scanner 4 (Tracelab).

Nous avons utilisé un autoanalyseur Beckmann pour l'analyse des acides aminés.

Les chromatographies en phase vapeur ont été effectuées à l'aide d'un appareil Aerograph 2700 (Varian) directement couplé à un spectomètre de masse DuPont 21-492 B.

Nous avons utilisé une colonne SE-30 à 3 % sur Varaport 30, de 1,5 m de long et 3,3 mm de diamètre (5 ft x 1/8 in). Ces colonnes sont balayées à 25 ml/mn par de l'azote(sans couplage), ou de l'hélium lorsque le chromatographe est couplé au spectomètre de masse.

IV - MATERIEL BIOLOGIQUE

Le microorganisme est cultivé sur le milieu de COHEN et WHEELER (28) ; au bout de 44 heures, la culture est refroidie puis centrifugée. L'endotoxine est extraite par la méthode au phénol-eau de WESTPHAL, LUDERITZ et BISTER (29).

Après dialyse du phénol, une centrifugation permet de séparer l'endotoxine des acides nucléiques ; elle est ensuite lyophilisée et c'est sous cette forme qu'elle a été utilisée au cours de toutes les expériences citées.

CHOIX DES CONDITIONS D'HYDROLYSE DE L'ENDOTOXINE

Nous avons dit précédemment qu'une hydrolyse alcaline de l'endotoxine pouvait être un traitement approprié pour obtenir des fragments dont l'analyse permettrait d'apporter des renseignements nouveaux sur la structure de l'endotoxine. C'est donc ce type de traitement que nous avons choisi.

Parmi les différentes bases utilisées pour une hydrolyse alcaline , nous avons sélectionné un agent que l'on puisse éliminer facilement afin que sa présence ne soit pas une gêne lors des manipulations ultérieures de séparation en milieu aqueux .

Nous avons eu recours à la potasse qui forme avec l'acide perchlorique un sel peu soluble dans l'eau glacée . L'avantage de cette méthode est que le perchlorate de potassium se formant lentement, on évite qu'une trop grande quantité de matériel organique ne soit entrainée avec le sel , ce qui n'est pas le cas avec la baryte par exemple.

Par ailleurs, en utilisant une résine échangeuse d'ions de faible acidité (IRC 50 H^+) nous pouvions fixer une très grande partie des ions potassium en amenant le pH de l'hydrolysat

à 8 ,5 ; en descendant plus bas le pH nous risquions de fixer aussi la glucosamine présente dans le lipopolysaccharide .

Toutefois nous avons remarqué , au cours des manipulations que cette méthode ne permettait pas d'éliminer la totalité des sels présents en trop grande quantité , elle présente donc un inconvénient certain lorsque l'on passe de l'échelle analytique à l'échelle préparative . C'est pourquoi une méthodologie différente a été ultérieurement suivie , l'hydrolysat étant dialysé contre de l'eau distillée , après avoir été neutralisé à l'aide d'acide chlorhydrique .

Nous avons choisi arbitrairement une concentration de potasse 2N , celle-ci étant généralement utilisée dans la pratique biochimique pour la saponification des lipides ,et considérée comme appropriée pour l'hydrolyse des diesters de l'acide phosphorique ou pyrophosphorique (30).

De par sa structure et sa sa composition chimique , le lipopolysaccharide est difficilement soluble dans l'eau .
Il en est de même pour les fragments lipidiques de l'endotoxine formés après un traitement acide.
Par contre le traitement alcalin que nous avons choisi pour fragmenter l'endotoxine , devait ,non seulement rendre le matériel soluble dans l'eau grâce à la saponification des acides gras, mais encore permettre l'utilisation de toute une gamme de gels de chromatographie .

Pour la chromatographie sur gel , des gels de polyacrylamide ont été utilisés de préférence à d'autres gels tels que les SEPHADEX ,constitués de sucres , ces derniers présentant des risques de libération de sucres contaminants .

I - Contrôle de l'action de la potasse sur les constituants majeurs de l'endotoxine

Il était évident qu'il n'était possible d'utiliser un traitement alcalin pour fragmenter la macromolécule que si un tel traitement ne dégradait pas les composants majeurs du lipopolysaccharide.

Pour déterminer si une telle dégradation avait lieu, nous avons dosé les sucres neutres, le KDO, le KDO- phosphorylé, les acides gras, les hexosamines, après traitement alcalin du lipopolysaccharide et ceci, en fonction du temps d'hydrolyse.

Le résultat des dosages a été rapporté dans le tableau 2.

Il est intéressant de noter que seulement 45 % des acides gras présents dans l'endotoxine de départ ont été libérés au cours de l'hydrolyse alcaline. Les acides gras restant liés, probablement par une liaison amide, ne sont libérés qu'après une hydrolyse acide forte (HCl 4N, 2h à 100°C). La présence de ces acides gras liés nous permettra, ultérieurement, d'étayer les conclusions que nous pourrons tirer quant à la structure générale de l'endotoxine.

Par ailleurs, ces résultats indiquent que seules les hexosamines, parmi les autres constituants testés, ont été affectées au cours de ce traitement (fig.5 p.23). On note en effet une diminution d'environ 50 % de la teneur en hexosamines de l'endotoxine. La destruction d'une si grande partie des hexosamines posait cependant un problème.

En effet, la glucosamine phosphate étant l'un des composés caractéristiques de la partie lipidique de l'endotoxine, il était à craindre qu'une destruction considérable de ce composé, au cours de la fragmentation, ne rende l'identification de l'aglycone du KDO non phosphorylé illusoire ; c'est pourquoi nous avons cherché à déterminer si la glucosamine phosphorylée avait survécu au traitement alcalin.

Il est impossible de doser la glucosamine phosphate indépendamment de la glucosamine lors du dosage des hexosamines présentes dans le lipopolysaccharide ; c'est pourquoi nous avons eu recours à une méthode semi-quantitative en soumettant le matériel issu d'une hydrolyse alcaline à une électrophorèse à pH 7,2.

	0	2	4	6	8	h
sucres neutres	11	11	11	11	11	%
KDO	0,35	0,36	0,35	–	0,35	%
KDO-P	0,24	0,24	0,23	–	0,24	%
glucosamine	19	9,5	9,2	9	8,5	%
acides gras	27,6	12,4	12,4	12,4	12,4	%

Tableau 2

Les dosages sont effectués sur 1 mg de LPS hydrolysés par KOH 2N avec une concentration de 5 mg/ml qui sera respectée au cours des expériences ultérieures.

CINETIQUE DE DEGRADATION DE LA GLUCOSAMINE DU LPS AU COURS D'UNE HYDROLYSE PAR KOH 2 N, 100°.

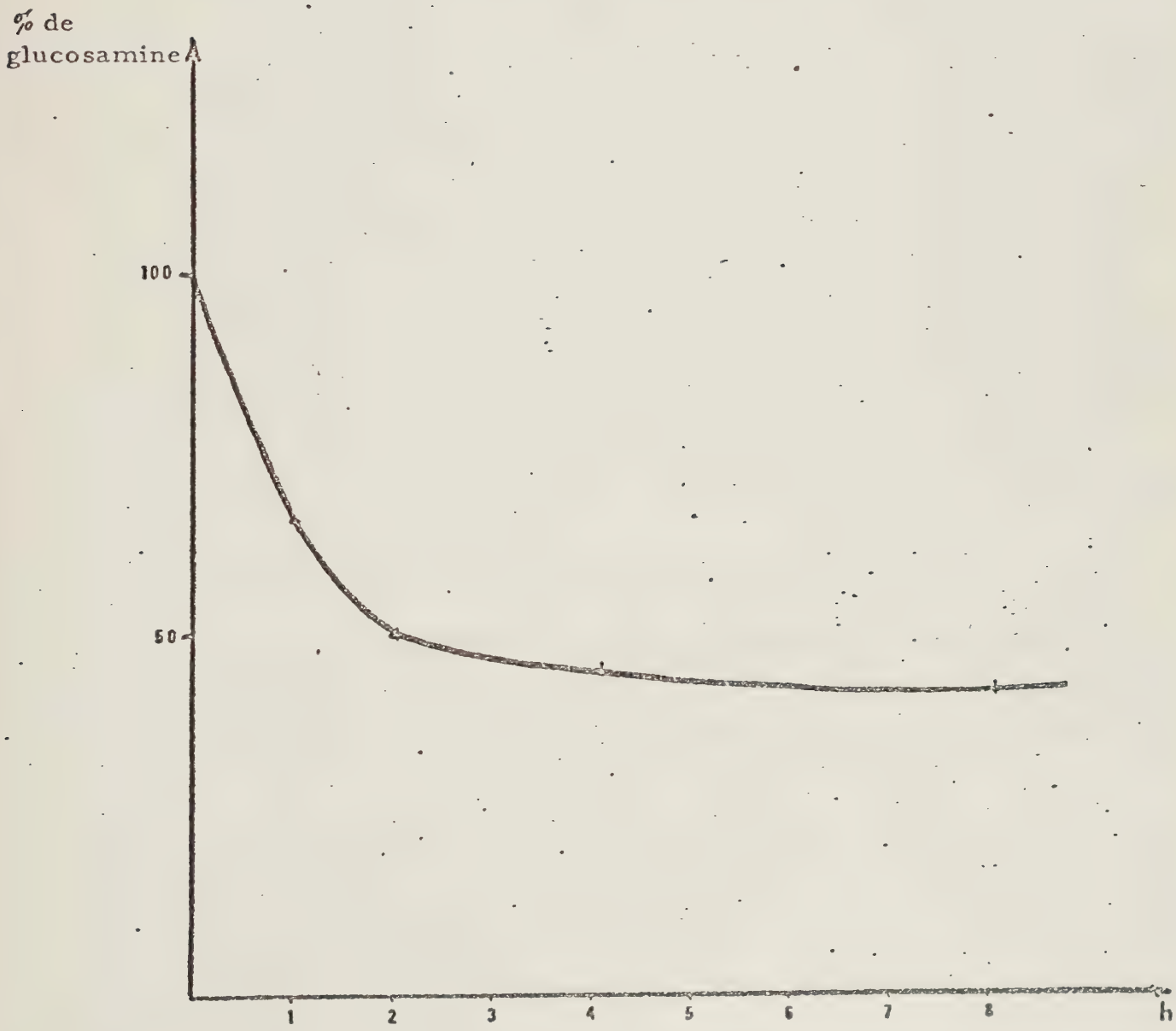


Fig. 5

Nous avons mis en évidence les composés azotés à l'aide de ninhydrine et comparé visuellement l'intensité des taches de glucosamine et de glucosamine-phosphate bien séparées dans les conditions utilisées. Il est apparu qu'une quantité importante de glucosamine phosphate avait survécu à l'hydrolyse alcaline. Ce constituant n'est donc pas détruit de manière spécifique.

II- Contrôle de l'efficacité de la fragmentation de l'endotoxine

Ayant observé les effets de l'hydrolyse alcaline sur les constituants majeurs du lipopolysaccharide, il nous restait à déterminer si un tel traitement conduirait à l'obtention d'une fragmentation suffisante, permettant de répondre aux questions posées.

Ayant opté pour la nature de la base à utiliser et pour sa concentration, il restait encore à déterminer la durée de l'hydrolyse.

Comme les vitesses d'hydrolyse sont en général très variables et que nous ne connaissons pas les effetsde la base employée sur les différentes liaisons qu'il convenait de briser pour obtenir la fragmentation voulue, il était évident que le temps aurait une incidence considérable sur la réussite de l'expérience. Le choix de ce temps d'hydrolyse ne pouvait être fait qu'en fonction des chromatogrammes, ceux-ci étant seuls représentatifs de la fragmentation ; c'est pourquoi nous avons soumis l'endotoxine à des hydrolyses de durée variable, en commençant arbitrairement par un temps de 2 heures.

- Hydrolyse par KOH 2N pendant 2 heures à 100° :

L'endotoxine de Bordetella pertussis de la souche L 84 a été hydrolysée à la concentration de 5 mg/ml par de la potasse2N pendant 2 heures à 100°. L'hydrolysat a été amené à pH 8,5 par addition de résine IRC 50 (H^+).

La solution a été filtrée, acidifiée (pH 2) par addition d'acide perchlorique (N), les acides gras libérés ont été séparés par trois extractions successives au chloroforme. On utilise chaque fois un volume de solvant égal à celui de la solution à extraire, et sépare les deux phases par centrifugation pour minimiser l'interphase.

Toutes les manipulations à pH acide se font dans la glace pour éviter une hydrolyse acide du produit. Le pH de la solution est alors amené à 6,5 par de la potasse (N). Le chloroforme dissous est chassé par un courant d'azote et le produit est lyophilisé. On obtient 150 mg de produit qui contient une quantité importante de perchlorate de potassium.

Chromatographie sur colonne de biogel P 10

Le lyophilisat est repris par 10 ml d'eau glacée. On filtre (pour séparer le perchlorate insoluble du produit soluble) et dépose le filtrat, concentré à un volume de 2ml, sur une colonne de biogel P 10 (83 cm x 1,5 cm). L'élution est faite par de l'eau distillée avec un débit de 0,16 ml/minute à température ambiante. On collecte des fractions de 1 ml. Le chromatogramme obtenu (fig. 6 page 26) présente 5 pics majeurs. Le volume d'élution du premier pic est de 50 ml, ce qui correspond au volume d'exclusion de la colonne.

Chromatographie sur colonne de biogel P 30

Le produit lyophilisé (9,7 mg) correspondant au pic exclu de l'expérience précédente est redissous dans 2 ml d'eau et chromatographié sur une colonne de biogel P 30 (90 cm x 3 cm) dans les mêmes conditions que précédemment. Le chromatogramme présente encore un pic exclu.

Sachant que les polysaccharides PS1 et PS2 sont inclus sur colonne de biogel P 10, nous nous attendions à retrouver la majorité des fragments obtenus au cours de l'hydrolyse alcaline, inclus sur ce même type de gel. En effet, dans le cas d'une structure lipidique identique à celle des Enterobactéries, le traitement alcalin employé devait cliver les liaisons pyrophosphate et "tronçonner" le squelette lipidique en petits fragments.

On observe en fait que la majorité du matériel exclu sur gel P10 l'est aussi sur gel P 30 : 4 % seulement des sucres neutres déposés sur la colonne de biogel P 10 y sont inclus.

FRACTIONNEMENT D'UN HYDROLYSAT DE LPS

(KOH 2 N, 2 h., 100°)

Colonne de Biogel P 10.
Eluant : eau distillée.

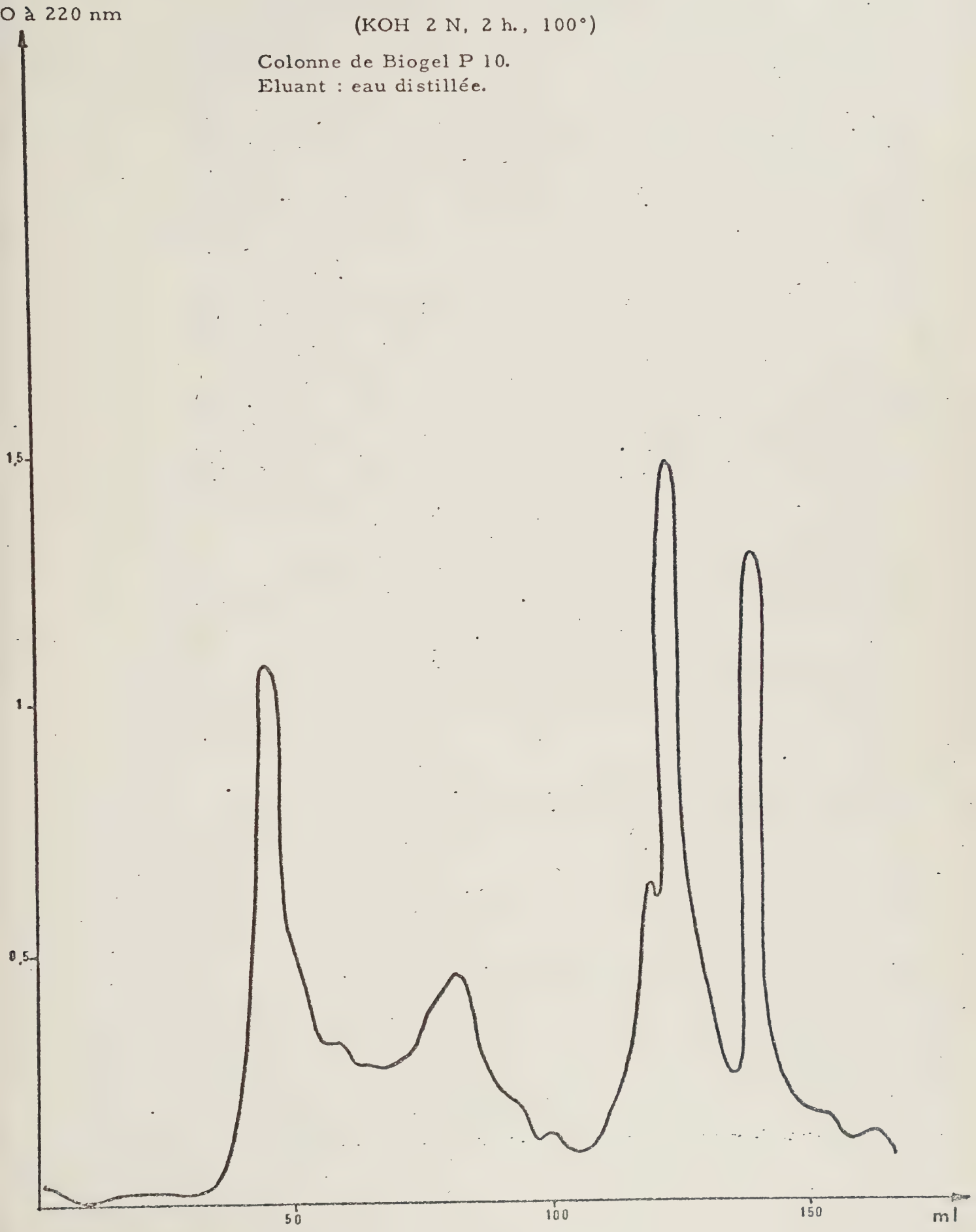


Fig. 6

Ayant remarqué que le traitement alcalin était accompagné d'une libération de phosphate inorganique, nous avons utilisé ce paramètre pour rendre compte de la fragmentation de l'endotoxine, en suivant la cinétique d'hydrolyse du phosphate en fonction du temps. Le phosphore libéré aux temps 15' ; 30' ; 1h ; 2h ; 4h et 8h est dosé. Le résultat, présenté sur la fig. 7 page 28 montre que la libération du phosphore atteint un plateau au bout de 7 heures d'hydrolyse et correspond à la libération de 30 % du phosphore total présent.

- Hydrolyse par KOH 2N 8h à 100°

En fonction des résultats précédents, 20 mg de lipopolysaccharide ont été soumis à une hydrolyse par KOH 2N, pendant 8 heures à 100°. L'analyse de la fragmentation par chromatographie sur gel P 30 indique qu'une forte proportion du matériel soumis au traitement alcalin est incluse et peut donc être analysée.

C'est donc un traitement par la potasse 2N pendant 8 heures à 100° que nous avons adopté pour la fragmentation de l'endotoxine.

Afin de séparer les sels non éliminés des fragments les plus inclus que nous voulions identifier, le produit a été chromatographié sur une colonne de biogel P 2.

- 50 mg de lipopolysaccharide ont été hydrolysés par 10 ml de potasse 2N 8h à 100° et traités de la même manière qu'au cours des expériences précédentes.

Le produit obtenu a été chromatographié sur une colonne de biogel P 2 (57 cm x 2 cm).

On observe sur le chromatogramme obtenu 7 pics dont le premier correspond au volume d'exclusion de la colonne (fig. 8 p.29). Le matériel correspondant à chacun des pics de chromatographie est lyophilisé. Différentes analyses effectuées sur ce matériel ont permis de mettre en évidence de l'éthanolamine, de la phénylalanine et des fragments osidiques de faible poids moléculaire.

CINETIQUE DE LIBERATION DU PHOSPHORE INORGANIQUE DANS LE LPS AU COURS D'UNE HYDROLYSE PAR KOH 2 N , A 100°.

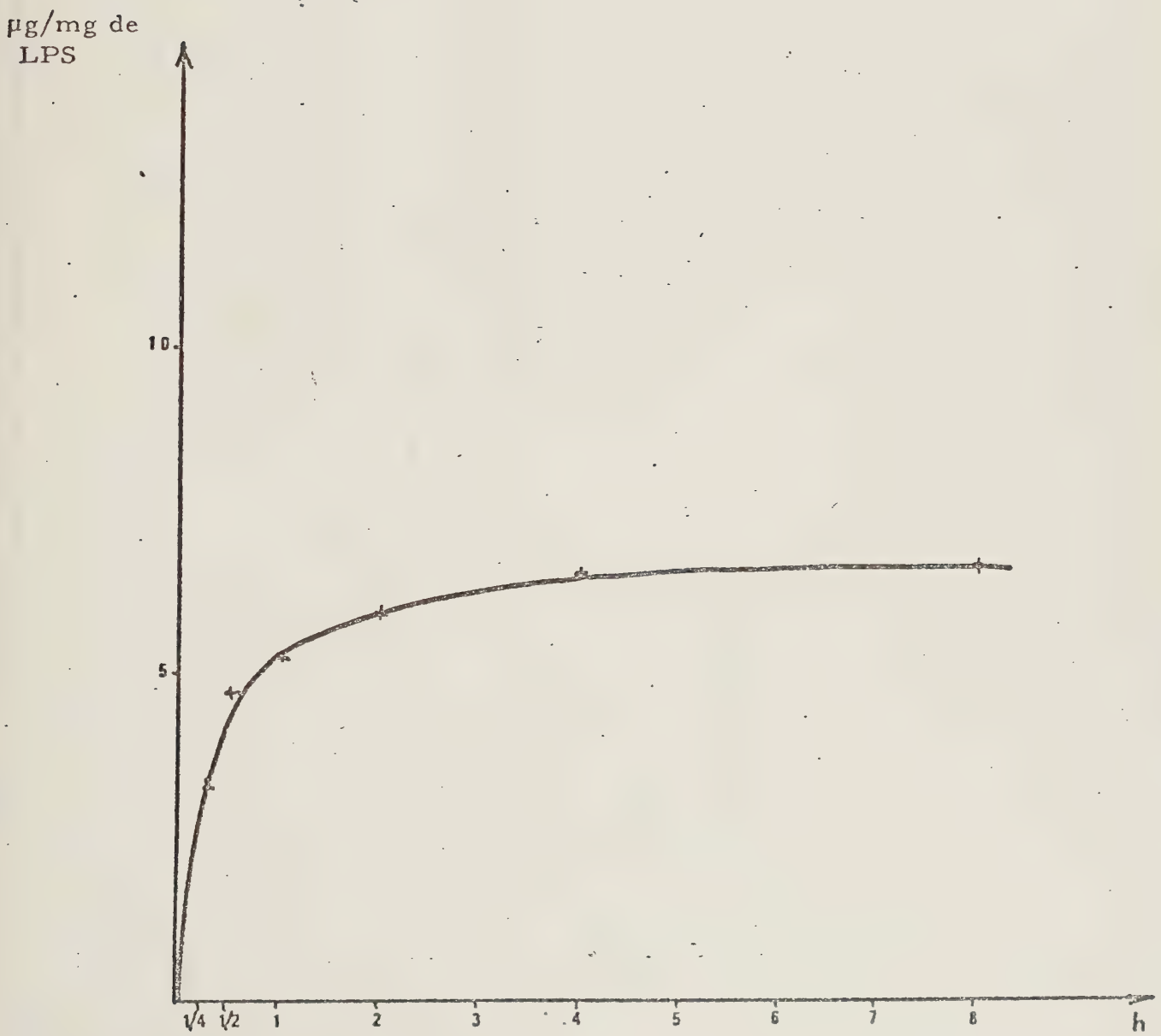


Fig. 7

FRACTIONNEMENT D'UN HYDROLYSAT DE LPS

(KOH 2 N, 8H, 100°)

Colonne de Biogel P2.
Eluant : eau distillée.

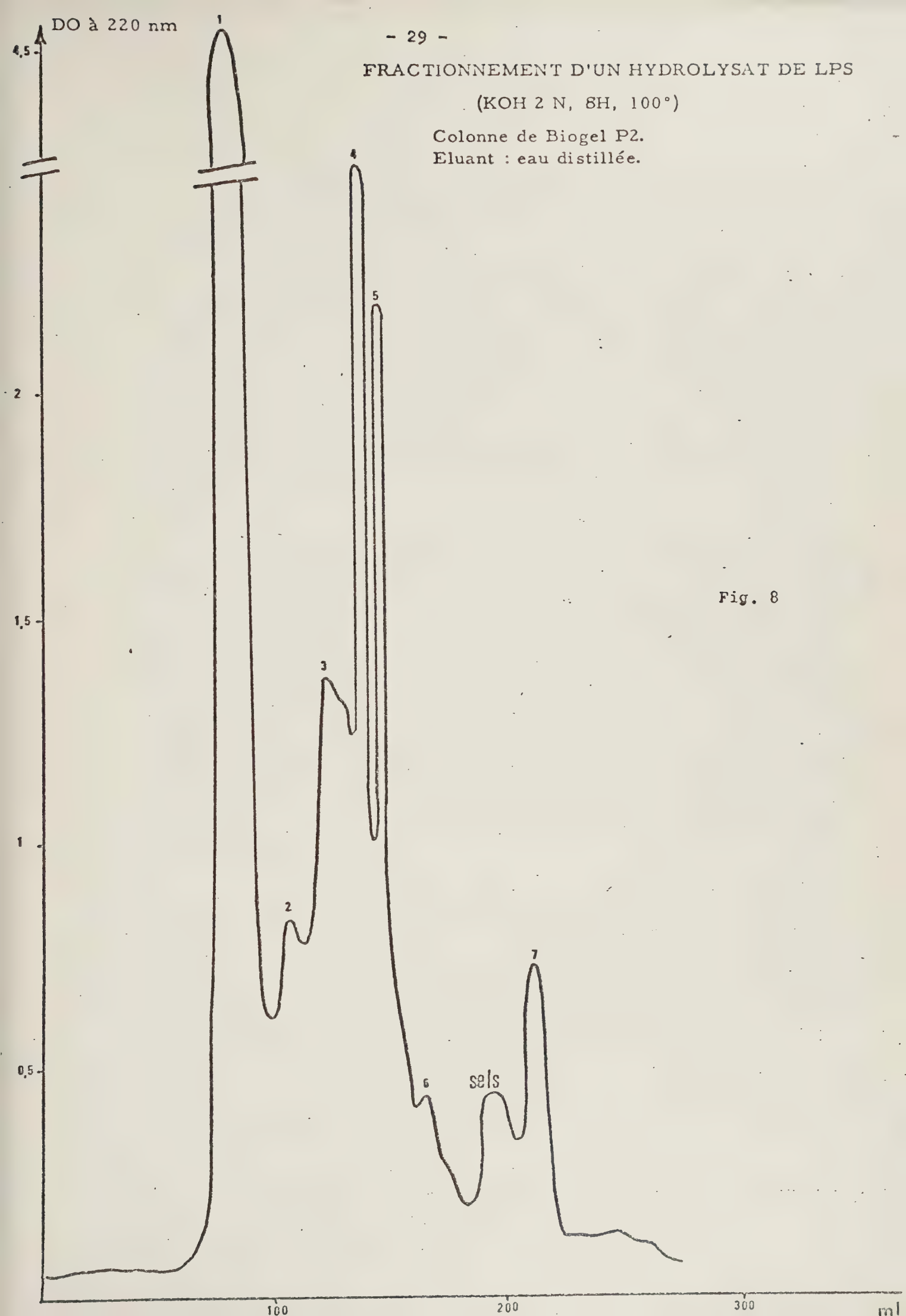


Fig. 8

L'éthanolamine étant un constituant de l'endotoxine, mis en évidence au cours d'études précédentes (15), sa présence dans l'hydrolysat n'est pas inattendue.

Au cours des études effectuées sur les lipopolysaccharides, de nombreux auteurs (31) ont mis en évidence la présence d'acides aminés et pensent qu'en fonction de leur importance relative, ceux-ci peuvent être considérés comme provenant d'une contamination. La présence de peptides, en tant que constituants de certains lipopolysaccharides, a été envisagée dans d'autres cas (32) (33). L'existence d'un peptide dans l'endotoxine de B. pertussis n'est donc pas improbable. Une étude à ce sujet est actuellement en cours au sein de notre équipe.

En ce qui concerne les fragments osidiques de faible poids moléculaire, nous savons que les polysaccharides PS1 et PS2 sont exclus d'une colonne de biogel P2, donc les petits fragments osidiques mis en évidence sur ce gel ne peuvent provenir que d'une fragmentation de ces polysaccharides. Ce qui est confirmé par les dosages de KDO effectués sur les différentes fractions. En effet, ce constituant n'est présent que dans les pics 1 et 2, c'est-à-dire dans les fragments osidiques de plus fort poids moléculaire. Or, les liaisons osidiques étant stables en milieu alcalin, il serait logique de trouver du KDO dans tous les fragments osidiques obtenus ; son absence dans les petits fragments montre bien que ceux-ci proviennent d'une fragmentation du PS1 et du PS2.

Il faut donc en conclure que l'un ou plusieurs des constituants de la chaîne osidique sont détruits au cours du traitement.

Si l'un de ces constituants était l'aglycone de la glucosamine, présente aux taux de 20 % dans les polysaccharides, ceci pourrait expliquer la destruction de 50 % de cette dernière dans le lipopolysaccharide traité par une base.

Afin de vérifier cette hypothèse, une cinétique identique à celle effectuée sur le lipoposaccharide a été tentée sur le PS1 préalablement réduit.

On a remarqué que la glucosamine était détruite de moitié dans le polysaccharide après 2 heures d'hydrolyse de la même manière que dans le lipopolysaccharide.

Les polysaccharides sont donc clivés en milieu alcalin au niveau d'un constituant encore inconnu et ce clivage entraîne la destruction d'une partie de la glucosamine. Cette remarque rend encore plus étonnante la faible proportion de matériel inclus sur biogel P 10 au cours des premières expériences. En effet, un enchaînement de glucosamines liées deux par deux par des ponts pyrophosphates devait libérer en milieu alcalin des disaccharides de glucosamine reliés aux polysaccharides PS1 et PS2.

Nous savons que ceux-ci sont inclus sur biogel P 10 (34), donc des fragments de poids moléculaire légèrement supérieur, pouvaient eux-mêmes être inclus sur ce type de gel. Nous venons de voir que les polysaccharides étaient clivés en milieu alcalin, ce qui aurait dû faciliter encore plus l'inclusion des fragments qui nous intéressent.

Une structure semblable à celle que postulent LUDERITZ et al.(9) pour la partie lipide de l'endotoxine des Salmonelles n'est donc pas applicable à celle de B. pertussis. Une publication récente (10,1976) portant sur l'analyse de lipide A de diverses bactéries confirme cette conclusion "l'analyse chimique du composant lipidique de quelques lipopolysaccharides (Brucella, Chromabacterium violaceum) donne des résultats inattendus, indiquant que ces préparations possèdent un squelette lipide différent.

FRAGMENTATION ET ANALYSE

Le KDO se trouvant en majorité dans le matériel exclu sur biogel P 30, il était nécessaire d'avoir recours à un autre type de gel pour séparer les fragments de l'endotoxine qui nous intéressaient plus particulièrement. Pour ce faire, nous avons utilisé le biogel P 60.

Par ailleurs, nous avons constaté qu'en partant d'une dizaine de milligrammes d'endotoxine, la quantité de matériel obtenue après le traitement alcalin et incluse dans le gel, n'était pas suffisante pour effectuer les analyses nécessaires à l'identification des fragments formés. Nous avons donc décidé de travailler sur des quantités dix fois plus importantes de lipopolysaccharide, mais alors l'élimination des ions potassium sous forme de perchlorate ne pouvait plus être pratiquée en raison des trop grandes quantités de sel formées. C'est pourquoi, dans cette série d'expériences, nous avons dû faire appel à la dialyse, comme nous l'avons mentionné au début de ce chapitre.

Le risque de perte de petits fragments au cours de la dialyse n'était pas un obstacle à notre étude, car comme nous avons pu le voir au cours des expériences précédentes, les fragments susceptibles de dialyser ne contiennent pas de KDO. Un contrôle de la dialyse par différents dosages a cependant été effectué, pour chaque préparation.

100 mg de l'endotoxine de B. pertussis de la souche L 84 ont été hydrolysés par 20 ml de KOH 2N pendant 8 heures à 100°. La solution a été acidifiée à 0° (pH 2) par addition d'acide chlorhydrique et les acides gras libérés, séparés par trois extractions successives au chloroforme. Le pH de la solution a été amené à 6,5 par de la potasse N puis, une dialyse contre de l'eau distillée a été effectuée jusqu'à disparition des sels dans les eaux de dialyse.

Contrôle de la dialyse

Les valeurs analytiques obtenues avant et après dialyse sont reportées dans le tableau ci-dessous.

	avant dialyse (%)	après dialyse (%)
KDO	0,35	0,35
KDO-P	0,25	0,25
Sucres neutres	11	9,4
Phosphore	2,3	1,6

Il ressort de ces données numériques, que l'on n'enregistre aucune perte de KDO ou de KDO-P au cours de ces opérations. Cette observation est importante, car comme nous avons pu le voir, le KDO et le KDO-P sont des produits "clés" pour notre étude. Ces résultats vont d'ailleurs de pair avec le fait, mis en évidence au cours des analyses précédentes, que ces acides aldulosoniques sont liés aux fragments de plus haut poids moléculaire.

La perte de sucres mesurée est notable ; elle correspond à 14 % des sucres neutres présents. Ce résultat confirme également l'observation faite précédemment, selon laquelle les polysaccharides PS1 et PS2 sont clivés en milieu alcalin ; ces coupures conduisent donc à libérer des fragments osidiques susceptibles de dialyser.

Nous avons établi que le traitement alcalin n'occasionnait aucune destruction de sucres, la diminution du pourcentage des sucres neutres n'étant effective qu'après dialyse.

Il s'ensuit que d'une part, la coupure des chaînes osidiques conduit à des fragments de faible poids moléculaire, donc susceptibles de dialyser et que d'autre part, la coupure de la chaîne osidique ne donne pas naissance à des sucres réducteurs. Ces observations ont une importance certaine pour la détermination de la structure des polysaccharides et sont d'autant plus précieuses que l'hydrolyse acide, même très poussée, ne libère, à partir de ces polysaccharides, que des monosaccharides ou des disaccharides, et ce, en très faible quantité.

La perte du phosphate inorganique était attendue, la cinétique de libération de ce constituant en milieu alcalin ayant montré que, au bout de 8 heures, il y avait une libération de 30 % du phosphore présent dans le lipopolysaccharide.

Ces contrôles ayant été effectués, le rétentat a été amené à un volume de 4 ml par concentration, et la moitié en a été déposée sur une colonne de biogel P 60 (87 cm x 1,5 cm). L'élution a été faite par de l'eau distillée avec un débit de 0,16 ml/mn à température ambiante. On a collecté des fractions de 1 ml.

Le diagramme représenté en pointillés sur la fig.9 page 35 est obtenu en portant l'absorption des fractions à 220 nm ; il présente trois pics majeurs dont le premier correspond au volume d'exclusion de la colonne. Des dosages de sucres neutres et de phosphore, respectivement représentatifs des fractions osidiques et lipidiques de l'endotoxine, ont été effectués sur les trois zones principales du chromatogramme : le pic exclu, la zone de faible absorbance, et les deux pics inclus réunis.

	I	II	III
Sucres neutres (µg)	1350	800	3000
Phosphore (µg)	200	200	400

Il ressort des résultats présentés dans le tableau ci-dessus, que c'est la zone III, de forte absorbance, qui représente la majorité du matériel inclus : c'est donc cette zone que nous avons soumise à une analyse détaillée.

FRACTIONNEMENT D'UN HYDROLYSAT DE LPS

(KOH 2 N, 8 h., 100°)

Colonne de Biogel P 60
Eluant : eau distillée.

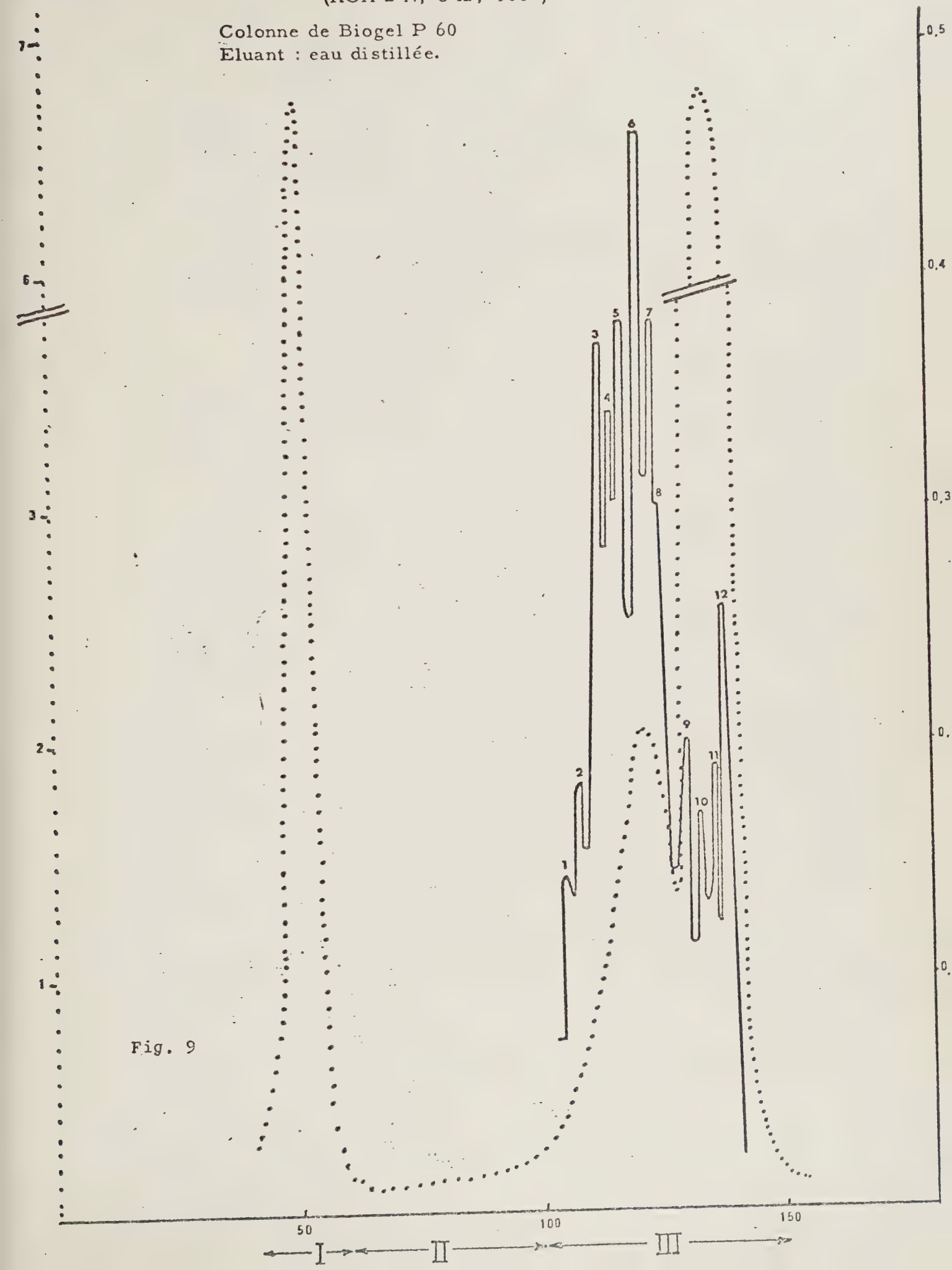


Fig. 9

Analyse de la zone III

Sachant que le KDO, tout comme le KDO-P sont substitués par une chaîne osidique contenant des sucres neutres, nous avons tout d'abord cherché à établir la répartition de ces sucres neutres dans la zone III du chromatogramme.

Les résultats du dosage, montrent que nous avons obtenu au cours de l'expérience une séparation très fine des fragments osidiques. La série de 12 pics obtenue est représentée en traits pleins sur le diagramme de la page 35.

Quatre expériences ont été effectuées suivant la même méthodologie : elles mènent aux mêmes résultats. Le nombre de pics observés et leur intensité restant les mêmes, les chromatogrammes sont bien représentatifs d'un phénomène reproductible de fragmentation de l'endotoxine.

Dès lors et sachant que le PS2 contenant son KDO-P caractéristique, était lié au lipide (15), pour répondre à la question que nous nous sommes posée, à savoir si le PS1 était ou non lié lui aussi au lipide par l'intermédiaire de son KDO, il nous fallait rechercher la présence du KDO-P et celle du KDO non phosphorylé dans les fragments séparés.

En effet, la mise en évidence du KDO non phosphorylé dans un fragment contenant à la fois des sucres neutres et du phosphore ainsi que la démonstration de l'absence de KDO-P dans ce même fragment apporteraient la preuve que la structure PS1 ⟶ Lipide est présente dans l'endotoxine de B. pertussis.

C'est pourquoi, des dosages de KDO, de KDO-P et de phosphore ont été effectués sur chacun des 12 pics obtenus.

L'analyse des résultats présentés dans le tableau 3 page 37, nous fait distinguer deux pics qui correspondent à nos exigences :

- le pic 2 contenant 9 fois plus de KDO que de KDO-P,
- le pic 12 ne contenant que le seul KDO.

Tous les autres pics contenant à la fois les deux acides aldulosoniques.

n° du pic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P	270	280	380	700	700	690	720	540	370	450	410	350
KDO	30	80	90	80	90	70	80	90	20	30	20	28
KDO-P	12	9	16	26	40	50	30	20	10	20	20	0
sucres neutres	311	400	822	755	844	1022	844	666	444	377	420	577

Les valeurs présentées dans ce tableau sont exprimées en nM/ml.

Tableau 3

Le matériel contenu dans ces pics ne représentant approximativement que 1 ou 2 mg de substance, deux séries d'expériences ont été effectuées.

Dans la première exploratoire, le matériel du pic 2 a été employé ; les résultats de celles-ci ont été confirmés au cours d'une deuxième série d'expériences effectuées sur le matériel contenu dans le pic 12.

Analyse du pic 2

Les dosages effectués sur le pic 2 ont permis de mettre en évidence des sucres neutres et du KDO ; ce dernier constituant étant caractéristique du PS1, nous pouvons dire que le pic 2 contient au moins un fragment du PS1.

Bien que la présence du phosphore dans ce même pic ait fortement suggéré qu'il contenait un fragment lipidique, encore fallait-il démontrer que le fragment osidique correspondant à un fragment du PS1 était lié à ce fragment lipidique.

Pour ce faire, nous avons soumis la substance contenue dans le pic 2 à une hydrolyse considérée comme spécifique de la liaison osidique du KDO et montré que ce traitement libérait effectivement un fragment du PS1 , le sucre terminal réducteur de ce fragment étant le KDO.

La solution correspondant au pic 2 est amenée à un volume de 1 ml.

Mise en évidence du clivage de la liaison osidique du KDO.

0,1 ml de la solution sont hydrolysés par 0,5 ml d'acide acétique pH = 3,4. L'hydrolysat est évaporé à sec, puis repris plusieurs fois par du toluène pour chasser l'acide. On dissout 1 mg de $NaBH_4$ dans 1 ml d'eau glacée : 0,1 ml de cette solution sont ajoutés au contenu d'une ampoule de NaB^3H_4 (activité totale : 5mCi -activité spécifique : 20 Ci/mM) et la solution radioactive est versée sur le produit sec du Pic 2.

On laisse le mélange pendant une heure dans un bain de glace en agitant de temps en temps, on détruit alors le borohydrure en excès en ajoutant 5 gouttes d'acide acétique pur, puis on évapore à sec sous vide.Le produit sec est alors dissous dans 1 ml d'eau et on décide d'utiliser 1/10e de cette solution pour l'analyse par électrophorèse après comptage de la radioactivité.

Eléctrophorèse à pH 1,9

10 µl de cette solution sont soumis à une électrophorèse à pH 1,9 (4000 volts) pendant 2 heures.

On observe après analyse du phérogramme qu'un produit radioactif a migré de 20 cm vers le pôle négatif.

Pour démontrer que c'est bien l'hydrolyse préalable qui a permis l'incorporation de tritium, un témoin sans hydrolyse est effectué : 0,1 ml de la solution à analyser sont traités par du borohydrure marqué, on constate alors qu'il n'y a aucune incorporation de radioactivité dans le produit traité.

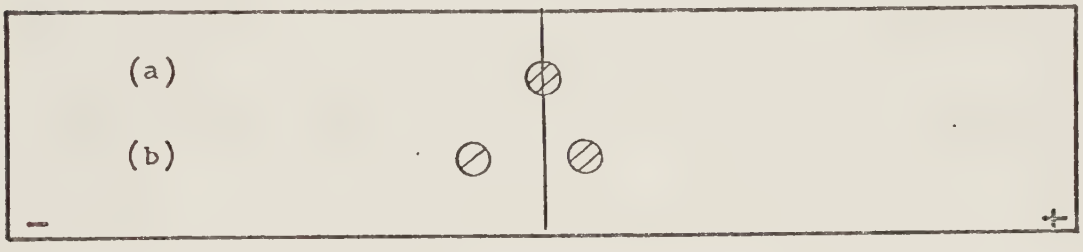
Bien que l'incorporation du tritium ne soit effective qu'après une hydrolyse considérée comme spécifique de la liaison osidique du KDO, nous avons cherché à montrer que le tritium était effectivement incorporé au niveau du KDO. Une électrophorèse préparative à pH 1,9 a été effectuée pour isoler le fragment contenant le produit radioactif. Le fragment a été alors hydrolysé par 1 ml d'HCl 2N, pendant 2 heures à 100° afin de libérer le produit à analyser. 1/20e de la solution à tester ont été soumis à une électrophorèse à pH5 (4000 volts) pendant 1h30. On observe un produit radioactif ayant migré vers le pôle positif au même niveau qu'un échantillon de KDO réduit mis en référence. L'hydrolyse par l'acide acétique à pH3,4 a donc bien clivé la liaison osidique du KDO contenu dans le pic 2. Une hydrolyse plus forte a permis de libérer ce constituant du fragment osidique qui le substituait.

Les expériences précédentes ayant démontré que la substance contenue dans le pic 2 satisfaisait, dans sa partie osidique aux conditions permettant de définir le point de liaison du PS1, il nous fallait apporter la preuve que l'aglycone possédait également les caractéristiques chimiques recquises.

Nous avons pu mettre en évidence la partie osidique du matériel du pic 2 par électrophorèse à pH 1,9. Ce comportement électrophorétique s'explique par la forte teneur en azote du PS1. Il était à penser que la partie lipidique du même matériel, contenant des résidus phosphoriques, ne paraîtrait chargée qu'à des valeurs de pH où l'acide phosphorique est ionisé ; c'est pourquoi, dans une deuxième série d'expériences, nous avons soumis le même matériel à un séparation par électrophorèse à pH 7,2, toujours après une hydrolyse par l'acide acétique de pH 3,4.

Electrophorèse à pH 7,2 :

- 0,2 ml de la solution contenant le matériel du pic 2 sont soumis à une électrophorèse à pH 7,2 (4000 volts) pendant 2 heures.
- 0,2 ml de cette même solution sont hydrolysés par 1 ml d'acide acétique à pH 3,4 pendant une heure à 100° et déposés en parallèle.



Une révélation du phérogramme à la ninhydrine et au nitrate d'argent montre que le produit non hydrolysé (a) révélé par les deux réactifs n'a pas migré. L'hydrolyse du même produit (b) fournit deux substance
- l'une révélable par le nitrate d'argent et la ninhydrine, migre de 2 cm vers le pôle positif,
- la seconde révélable seulement par le nitrate d'argent migre de 4 cm vers le pôle négatif. Cette dernière substance migre comme le fragment du PS1, marqué au tritium, et soumis à une électrophorèse dans les mêmes conditions au cours d'une expérience parallèle. On peut donc conclure que l'hydrolyse à l'acide acétique, clivant la liaison osidique du KDO présent, fournit deux fragments, migrant, chacun en fonction de sa charge propre dans des directions opposées.

Ilrestait donc à montrer que l'aglycone du KDO présentait bien les caractéristiques d'un fragment lipidique comme le laissait supposer la forte teneur en phosphore du pic 2 et du pic 12.

Analyse du pic 12

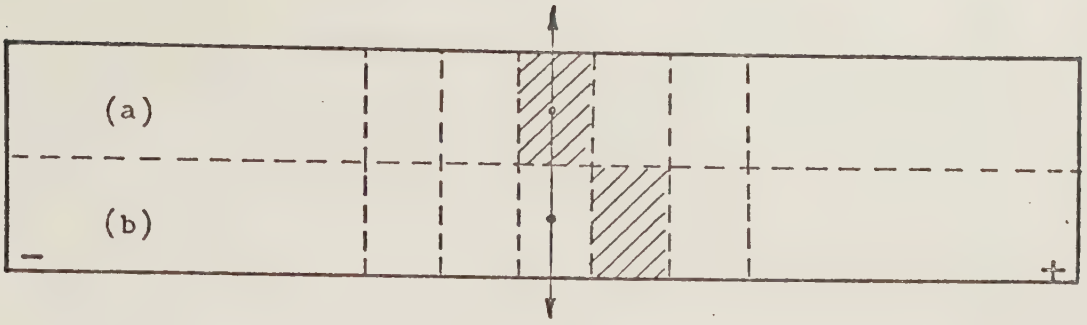
La solution correspondant au pic 12 est amenée à un volume de 1ml.

Le pic 12 ne contenant pas de KDO-P, le phosphore qu'il renferme ne peut provenir que de la partie lipidique de l'endotoxine. C'est pourquoi, nous avons choisi, tout d'abord, le dosage du phosphore pour caractériser et détecter les fragments lipidiques contenus dans le pic 12.

Recherche et caractérisation du matériel lipidique contenu dans le pic 12 :

- Phosphore

. 50 µl de la solution mère sont soumis à une électrophorèse à pH 7,2 (4000 volts) pendant 2 heures.
. On analyse en parallèle 50µl de la même solution hydrolysée par l'acide acétique à pH 3,4 pendant 1 heure à 100°.
Le phérogramme est alors découpé en bandes de trois centimètres, on élue les bandes par de l'eau et l'on dose le phosphore dans les éluats.
. On détermine la teneur en phosphore d'un échantillon de 50µl de la solution mère.



Il ressort de ces dosages que la totalité du phosphore de l'échantillon déposé se retrouve sur la ligne de base dans le cas du produit non hydrolysé (a). La quantité de phosphore trouvée correspond à celle mise en oeuvre, il n'y a donc pas eu de perte de phosphore. Cette même quantité de phosphore est encore retrouvée dans une zone située vers le pôle positif à 4 cm de la ligne de base pour le produit hydrolysé par l'acide acétique à pH 3,4 (b) alors que les zones complémentaires dans l'un et l'autre cas ne répondent pas au dosage du phosphore. Ces résultats indiquent que c'est le clivage de la liaison osidique du KDO qui permet la migration de la substance phosphorylée contenue dans le produit isolé à partir du pic 12. Nous confirmons donc d'une part l'expérience précédente et nous constatons d'autre part, que le clivage de la liaison osidique du KDO libère un produit non seulement aminé, mais de plus phosphorylé. Celui-ci présente donc bien les caractéristiques d'un fragment de la partie lipidique de l'endotoxine.

La démonstration de la présence de phosphate dans la partie anionique du matériel contenu dans le pic 12, était une forte présomption en faveur de la présence d'un fragment lipidique dans ce pic. Cependant, il fallait encore prouver plus précisemment que le phosphate se trouvait bien dans une liaison reconnue comme faisant partie des "Lipides A". La glucosamine-phosphate étant un constituant spécifique de la partie lipidique de l'endotoxine, c'est ce composé que nous avons cherché à isoler à partir du pic 12.

- Glucosamine-phosphate

0,2 ml de la solution du pic 12 ont été hydrolysé par 0,5 ml d'acide chlorydrique 4 N pendant 2 heures à 100°, puis réduits par le borohydrure de sodium tritié.

Afin de séparer la glucosamine-phosphate des autres constituants réduits au cours de la manipulation, la solution a été déposée sur une colonne de résine, DOWEX G 50 (H^+) (20 cm x 1 cm). La résine a été éluée par de l'eau distillée à température ambiante et des fractions de 2 ml ont été collectées. Un produit radioactif, élué en même temps qu'une référence non radioactive de glucosaminitol-phosphate a été ensuite analysé par électrophorèse et chromatographie sur papier.

- Par électrophorèse à pH 7,2 (4000 volts) pendant 1h30, on a fait migrer, en même temps que le produit radioactif à identifier, une référence de glucosaminitol-phosphate tritié et, afin qu'aucune erreur d'appréciation ne puisse fausser les résultats, un mélange du produit et de la référence. On peut voir sur la figure10 page 44 que le produit radioactif à identifier migre au même niveau que le glucosaminitol-phosphate de référence, et que le mélange des deux, n'ayant subi aucune séparation, est détecté sur le phérogramme sous la forme d'un pic unique.

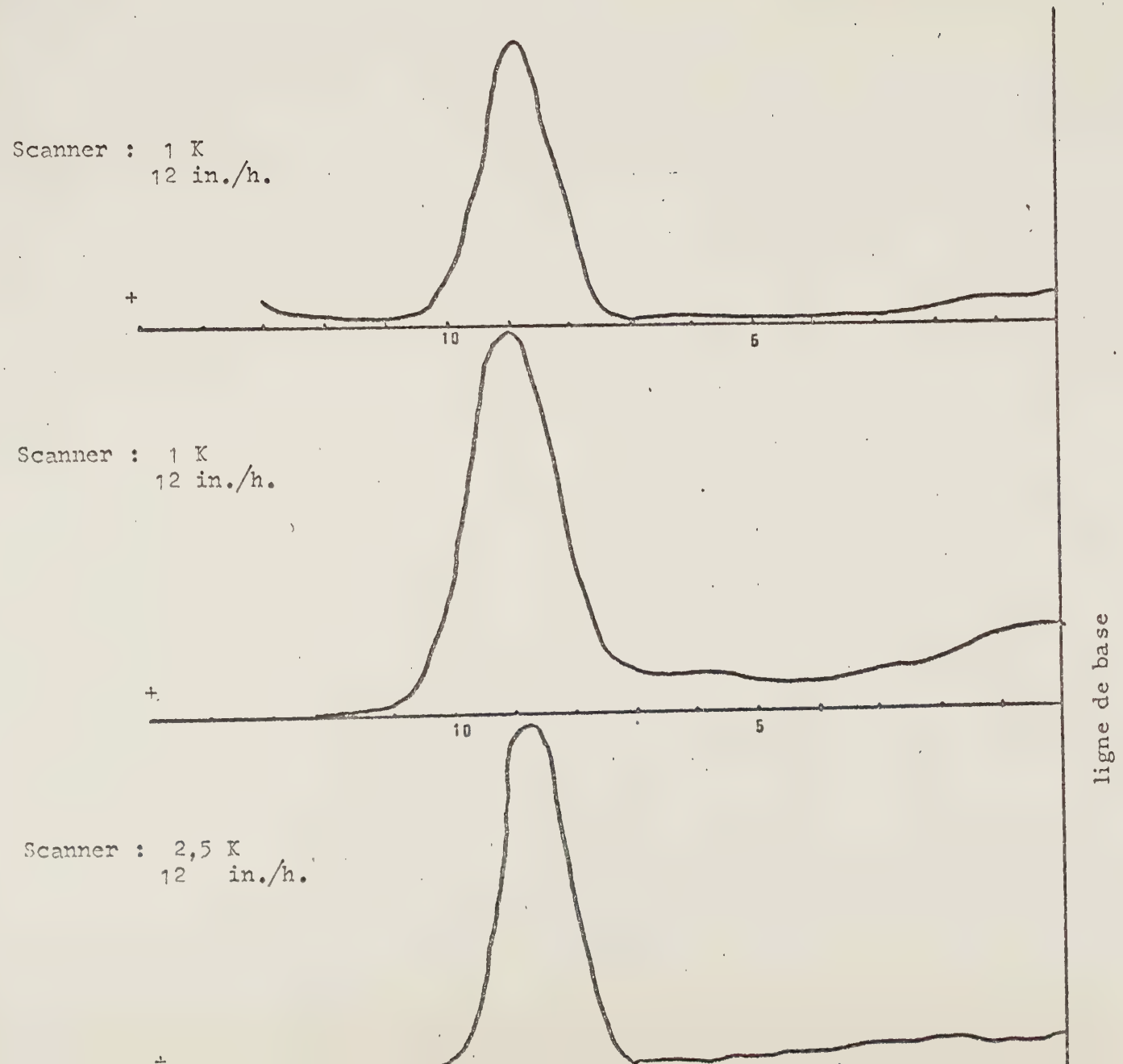
- Le même résultat a été obtenu en faisant migrer le produit en chromatographie ascendante sur papier dans les solvants : (acide isobutyrique ; ammoniaque) pendant 20 heures, et (méthyl-éthyl-cétone ; acide formique ; méthanol ; eau) pendant 5 heures.

- Une hydrolyse acide du produit devait nous apporter une dernière confirmation. Le produit, hydrolysé par 0,5 ml d'acide chlorhydrique 6N pendant 10 heures à 100°, est soumis à une électrophorèse à pH 7,2 (4000 volts) pendant 1 heure. On détecte alors un produit radioactif au niveau de la référence de glucosaminitol.

Nous avons ainsi apporté la preuve que la glucosamine-phosphate était présente dans le produit correspondant au pic 12.

La démonstration de la présence de glucosamine phosphorylée dans le fragment représenté par le pic 12, était un argument de poids en faveur de l'existence de la structure PS1 —→lipide dans l'endotoxine de B. pertussis. Cependant, seule la présence d'acides gras, caractéristiques du "Lipide A" pouvait en apporter une preuve définitive. Nous avons vu précédemment que l'hydrolyse alcaline mise en oeuvre pour fragmenter l'endotoxine ne saponifiait qu'environ 50 % des acides gras présents dans la macromolécule.

ELECTROPHORESE pH 7,2 (4000 V/75 cm) 1 h.30



produit du pic 12

référence de glucosaminitol-P.

produit du pic 12 + référence de glucosaminitol-P.

Fig. 10

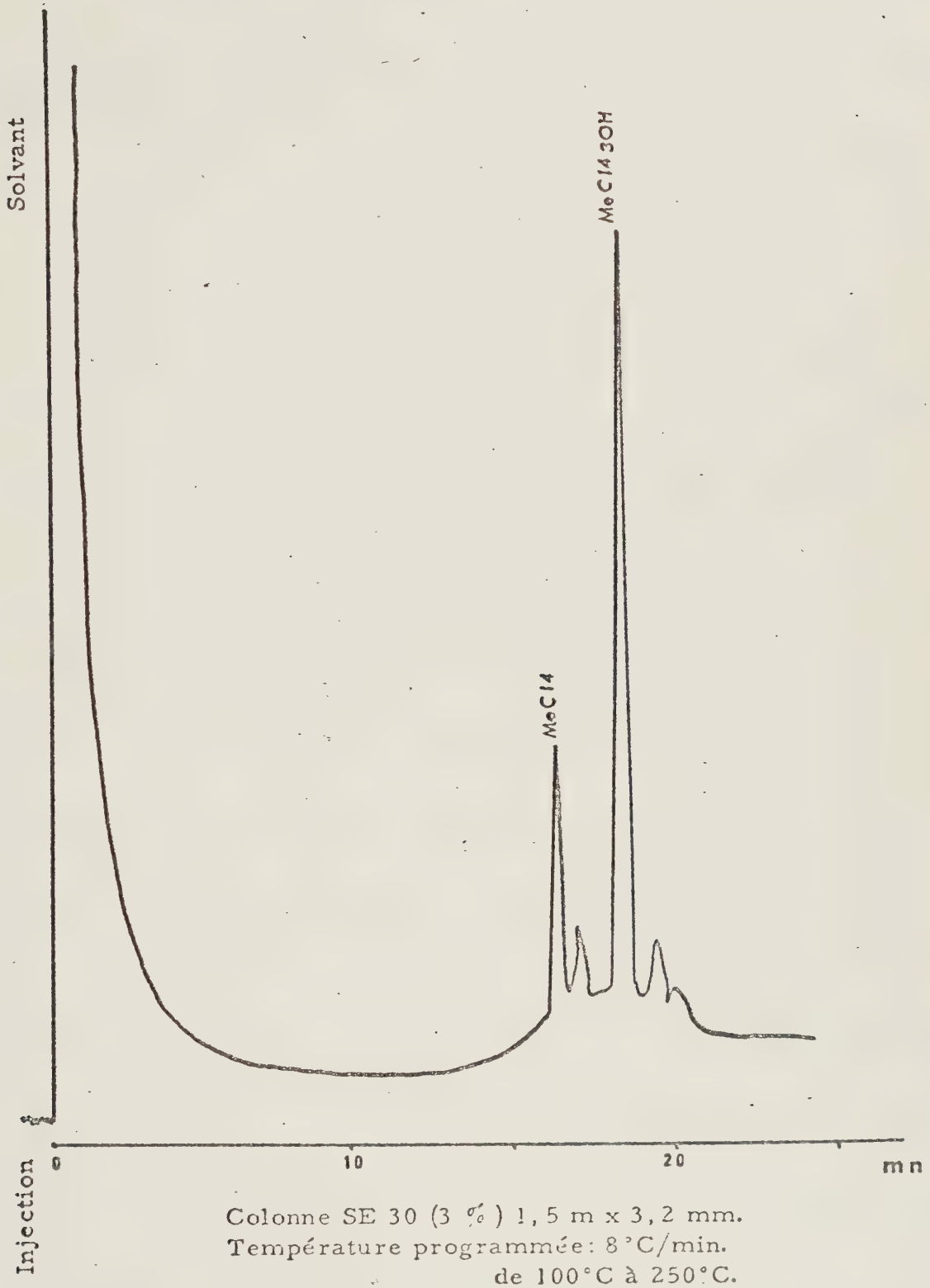
Ces acides gras liés par des liaisons amides devaient donc, selon notre hypothèse, être présents dans le fragment représenté par le pic 12. C'est pourquoi, nous avons cherché à libérer ces acides gras par une hydrolyse acide appropriée et à les mettre en évidence.

- Acides gras

0,2 ml du produit correspondant au pic 12 ont été hydrolysés par HCl 4N, 2h à 100°, les acides gras ainsi libérés ont été extraits par le chloroforme, la phase chloroformique séchée, puis traitée par du diazométhane afin de transformer les acides gras en esters méthyliques qui ont été alors analysés par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatogramme obtenu (fig. 11 page 46) après une injection du dizième de la substance, présente deux pics principaux identifiés par spectrométrie de masse (fig 12 p 47). Le premier pic correspond à l'ester méthylique de l'acide myristique (Me C_{14}) le second à celui de l'acide 3-Hydroxy-myristique (Me C_{14} - 3- OH) (fig 13 p 48).

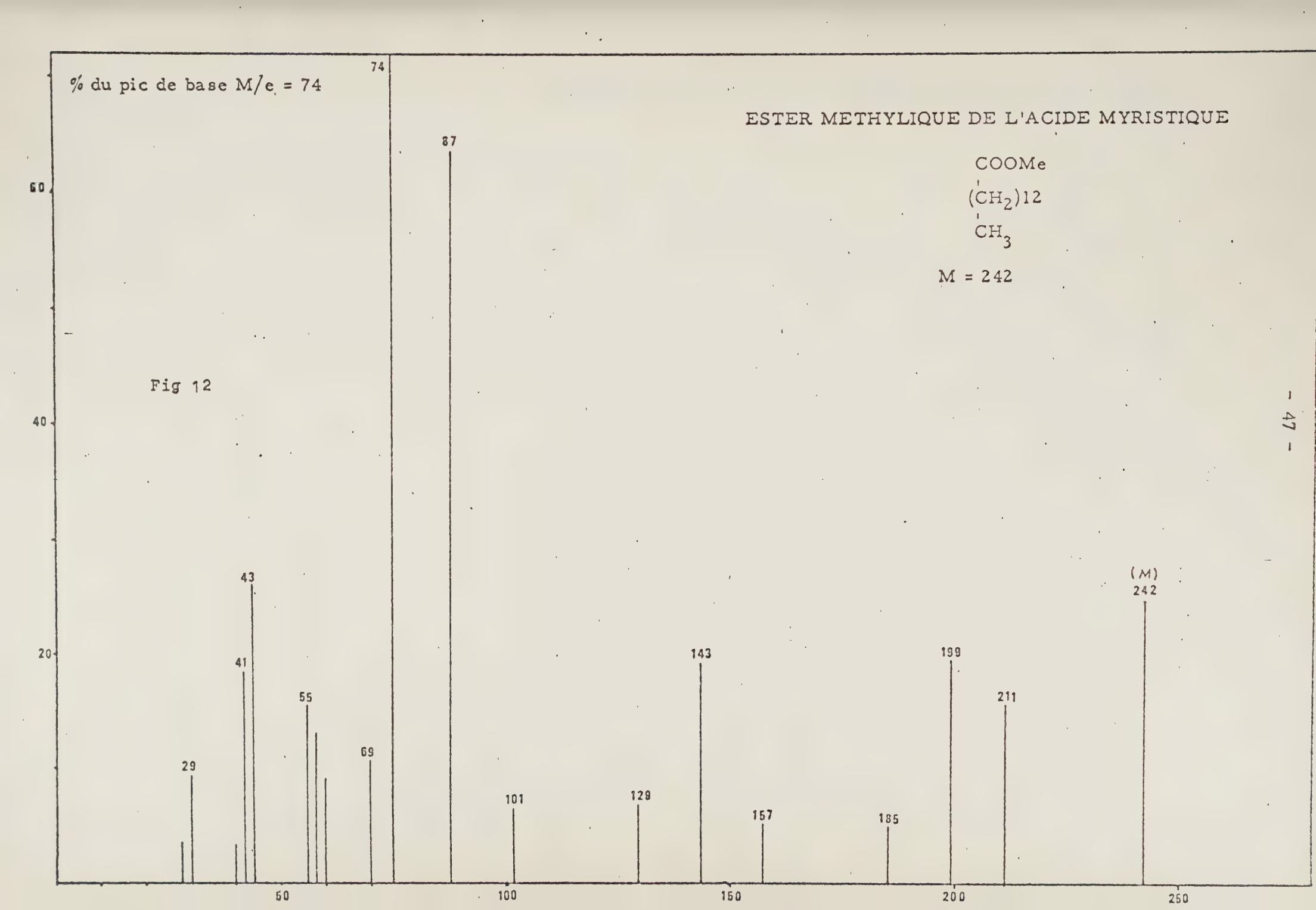
Les expériences précédentes ont permis de montrer qu'une hydrolyse spécifique de la liaison osidique du KDO, libérait à partir du matériel contenu dans le pic 12, un fragment osidique identifiable à une portion du PS_1 et un fragment contenant tout le phosphore de l'échantillon. Comme au moins une partie de ce phosphore était présente sous forme de glucosamine-phosphate et comme l'échantillon contenait aussi des acides gras liés, nous avons conclu que le PS_1, tout comme le PS_2 était lié à la partie lipidique de l'endotoxine de *B.pertussis*.

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE
DES ESTERS METHYLIQUES DU PIC 12.



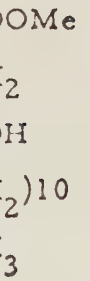
Colonne SE 30 (3 %) 1,5 m x 3,2 mm.
Température programmée: 8°C/min.
de 100°C à 250°C.

Fig. 11


% du pic de base M/e = 74
74
ESTER METHYLIQUE DE L'ACIDE MYRISTIQUE
COOMe
(CH2)12
CH3
M = 242
Fig 12
87
60
40
20
43
41
55
69
29
101
129
143
157
185
199
211
(M)
242
50
100
150
200
250

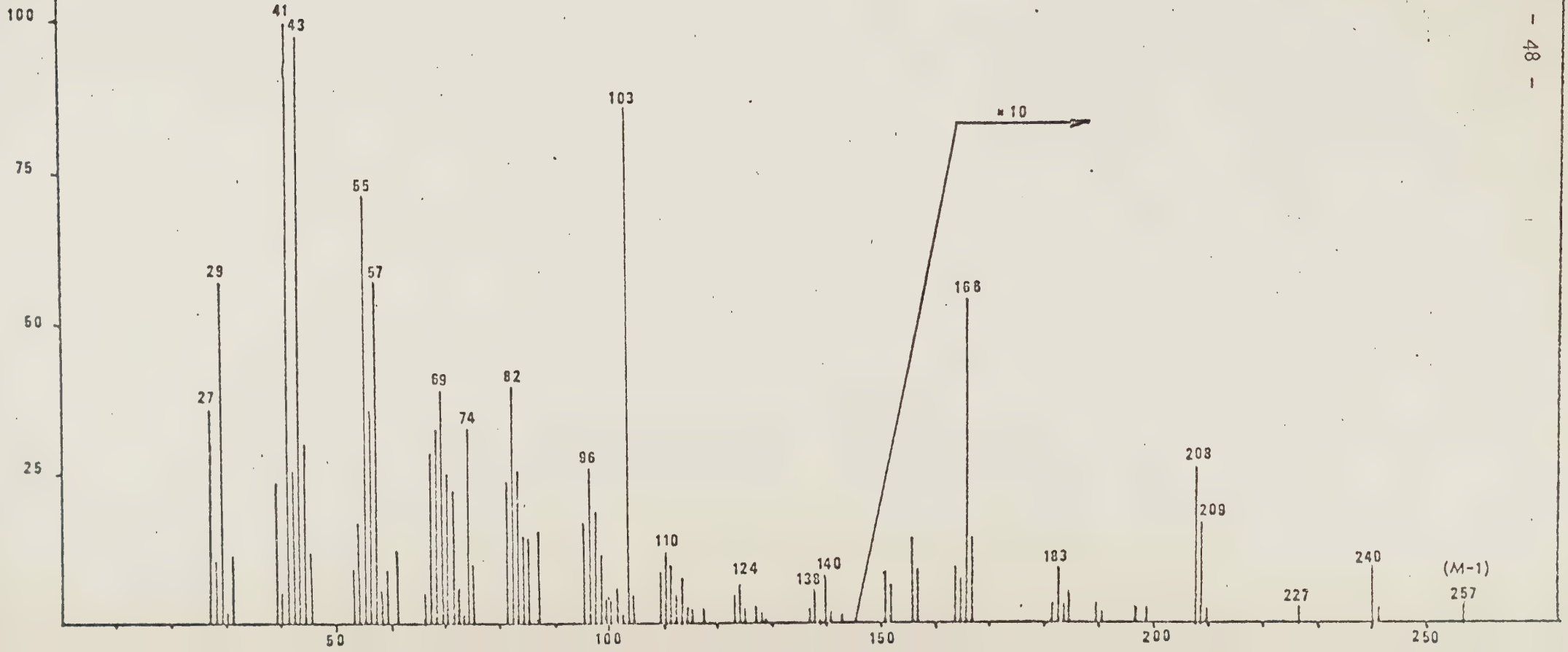
% du pic de base M/e = 41

ESTER METHYLIQUE DE L'ACIDE β-HYDROXY MYRISTIQUE



M = 258

Fig. 13



RESUME ET CONCLUSIONS

Le but du présent travail était de préciser le schéma structural de l'endotoxine de B. pertussis.

Les études précédentes effectuées sur cette macromolécule avaient permis d'établir la présence de trois grandes régions : une de nature lipidique et deux autres de nature osidique, ces deux dernières se terminant, chacune, par une molécule de KDO. L'un de ces polysaccharides (le PS2) est relié à la région lipidique de l'endotoxine par l'intermédiaire d'un KDO phosphorylé. L'autre, (le PS1) qui se termine par un KDO non phosphorylé, n'avait pas, jusqu'à présent, de localisation dans la structure élaborée.

Deux possibilités se présentaient quant au rattachement du PS1 au reste de la macromolécule. En effet, celui-ci pouvait être relié à la partie lipidique tout comme le PS2, ce qui conduisait à la structure globale $\begin{matrix} PS1 \\ PS2 \end{matrix}\!\!>$ lipide. Il pouvait aussi être relié au PS2 directement, ce qui donnait alors la structure PS1-PS2-lipide

Pour distinguer entre ces deux possibilités, l'endotoxine a été soumise à une hydrolyse alcaline (KOH 2N ; 8h à 100°). Les fragments obtenus ont pu être séparés sur colonne de Biogel P 60. L'analyse de tous les pics obtenus, au nombre de 12, a permis de mettre en évidence la présence de KDO et de KDO-P dans tous les fragments, sauf un. Celui-ci, le pic 12, ne contenait que du KDO. Une analyse de ce pic après une hydrolyse acide forte (HCl 4N ; 2h ; à 100°), a permis d'identifier les constituants spécifiques de la partie lipidique de l'endotoxine : la glucosamine phosphate ainsi que les acides myristiques et β hydroxy-myristiques. Un traitement acide faible (acide acétique pH 3,4), généralement employé pour cliver la liaison désoxy-cétosidique du KDO, libère, à partir de la substance présente dans le pic 12, deux fragments portant des charges opposées ; ils sont séparables par électrophorèse à pH 7,2. Celui qui est chargé négativement peut être révélé

au nitrate d'argent et à la ninhydrine ; il contient aussi la totalité du phosphore de l'échantillon. Le second, chargé positivement, peut-être révélé au nitrate d'argent et ne contient pas de phosphore Le PS1, dont le KDO non phosphorylé est la composante caractéristique, ne contient pas de phosphore : par conséquent, la totalité du phosphore trouvé dans ce type de fragment ne peut être due qu'à la présence d'une portion lipidique. Il s'ensuit que le matériel contenu dans le pic 12 est constitué d'un fragment osidique lié à un fragment lipidique par l'intermédiaire d'une molécule de KDO : par conséquent, c'est la structure $\begin{matrix} PS1 \\ PS2 \end{matrix}$ > lipide qui doit être assignée à l'endotoxine de B. pertussis.

Par ailleurs, les effets du traitement alcalin sur l'endotoxine ont aussi permis de montrer que le schéma structural établi pour la région lipidique des endotoxines des Entérobactéries ne pouvait être étendu à B. pertussis.

REFERENCES

1- BRAUN V.

Molecular organization of the rigid layer and the cell wall of Escherichia coli.
The Journal of Infectious Diseases. Supplement to volume 128 (July 1973)

2- WESTPHAL O.

Récentes recherches sur la chimie et la biologie des endotoxines des bactéries à gram négatif.
Ann. Institut Pasteur 98, 789 (1960).

3 - WESTPHAL O. et K. JANN.

Methods of carbohydrate chemistry
R.L. Whistler et M.L. Wolfrom, ed, Academic Press, New York, 5, 83, (1965).

4 - SALTON M.R.J.

The bacterial cell wall.
Elsevier, Amsterdam, 1 (1964).

5 - LUDERITZ O., A.M. STAUB et O. WESTPHAL

Immunochemistry of O and R antigens of Salmonella and related Enterobacteriaceae.
Bacteriol. Rev., 30, 192 (1966).

6 - GALANOS C

Activité Biologique de lipopolysaccharides et du Lipid A.
Thèse(Fév. 1974).

7 - GMEINER J., O.LUDERITZ et O. WESTPHAL

Biochemical studies on lipopolysaccharides of Salmonella R mutants. Investigations on the structure of the Lipid A compenent.
Eur J. Biochem 7, 370-379 (1969).

8 - GMEINER J., M. SIMON et O. LUDERITZ

The linkage of phosphate groups and of 2-keto-3-deoxy-octonate to the Lipid A component in a Salmonella minnesota lipopolysaccharide.
Eur. J. Biochem 21, 355-356 (1971).

9 - LUDERITZ O.,C.GALANOS, V.LEHMANN, M.NURMINEN, T. RIETSCHEL G.ROSENFELDER, M.SIMON, et O. WESTPHAL.

Lipid A : Chemical structure and biological activity. The Journal of Infections Diseases. Supplement to volume 128 (July 1973).

10 - HASE S., E. TH. RIETSCHEL

Isolation and analysis of the Lipid A backbone. Lipid A structure of lipopolysaccharides from various bacterial groups.
Eur. J. Biochem 63, 101-107 (1976).

11 - WESTPHAL O., J.GMEINER, O.LUDERITZ, A.TANAKA et E. EICHENBERGER.

Chemistry and biology of the Lipid A. domponent of entero-bacterial lipopolysaccharides.
Colloques internationaux du CNRS 174, 70-77 (1967).

12 - DROGE W., V. LEHMANN et coll.

Structural investigation on the 2-keto-3-deoxyoctonate region of lipopolysaccharide.
Eur. J. Biochem. 14, 175-184 (1970).

13 - FULLER N., M.C. WU, R.G.WILKINSON, E.C. HEATH.

The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in Escherichia coli.
J.Biol. Chem. 248, 7938- 7950 (1973).

14 - BORDET J.

Brux. Med., 16, 503-505 (1936).

15 - CHABY R.

Element structuraux de l'endotoxine de Bordetella pertussis
Thèse (nov. 1974) Orsay.

16 - MAC LENNAN A.P.

Specific lipopolysaccharide of Bordetella.
Biochem. J. 74, 398 (1960).

17 - BACH J.F.

Immunologie, Flammarion
Chap. p. 73

18 - CREACH O.

Contribution à l'étude des propriétés biologiques de lipides constitutifs de l'endotoxine d'Eberthella thyphi.
Thèse (Juin 1966) Lyon.

19 - COLOBERT L., F. BRUN, P. SERVANT et O. CREACH.

Influence de la thymectomie, chez le lapin nouveau né, sur les propriétés adjuvantes de l'immunité manifestée par l'endotoxine de Salmonella thyphi et sa fraction lipidique.
Colloques Internationaux du CNRS. 174, 241-253 (1967)

20 - LUDERITZ O., W. DROGE, P. MUHLRADT, E. RUSCHMANN et O. WESTPHAL.

Biochemical investigations on the core of Salmonella lipopolysaccharides.
Colloques Internationaux du CNRS. 174, 96-108 (1967)

21 - DUBOIS M., K.AGILLES.

Coloric method for determination of sugars and related substances.
Analytical chemistry, 28, 3 (1956).

22 - RONDLE C.J.M. et W.T.J. MORGAN.

The Rondle and Morgan procedure for amino sugars.
Biochem. J. 61, 586, (1955).

23 - WARAVDERAR V.S. et D. SASLAW .

A sensitive colorimetric method for the estimation of 2-desoxy sugars with the use of the malonaldehyde thiobarbituric acid reaction .
J. Biol. Chem., 234 ,1945-1950 (1959).

24 - CHARON.D.

Synthèse, reactions et dosage d'acide 3-désoxy-aldulosonique substitué .
Thèse (Avr. 1974) Orsay .

25 - CHEN.O.S.,TORIBARA, WARNER .

Microdetermination of phosphorus .
Analytical Chemistry 28 , 11 (1956)

26 - SNYDER F.,N STEPHENS .

A simplified spectrophotometric determination of ester group in lipid .
Biochem. Biophys. Acta .,34 ,244-247 (1959) .

27 - TREVELYAN.W.E ,D.P.PROCTER ,et J.S. HARRISON .

Detection of sugars on paper chromatograms .
Nature , 166 ,444-445 (1950) .

28 - COHEN.S.M.et M.W. WHEELER.

Amer. J. Public Health ,36 ,371-376 (1946) .

29 - WESTPHAL O., O. LUDERITZ et F. BISTER.

Uber die extraction von bacterien mit phenol-wasser.
Z. Naturforsch. 76, 148-155, (1952).

30 - RIVAILLE P. et L. SZABO.

Sucres phosphorylés -V- La formation d'osides phosphates 3 à partir d'osides (phenyl-phosphates) - 4,6 par trans estérification intramoléculaire.
Bulletin de la société Chimique de France, page 712 (1963).

31 - NOVOTNY A.

Chemical structure of a phosphomucolipid and its occurence in some strains of Salmonella.
J. Am. Chem. Soc. 83, 501-503 (1961).

32 - NOVOTNY A.

Microbiol toxins 4, 315. (1971)

33 - WOBER W et ALAUPOVIC P.

Studies on the protein moiety of endotoxin from gram-negative bacteria.
Eur. J. Biochem. 19, 340-356, (1971).

34 - LEDUR A.

Obtention et analyse globale d'un glycolipide de Bordetella pertussis.
Thèse (1973) Orsay.